

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÉSSICA DE OLIVEIRA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE  
*BCHE* DA BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA E A OBESIDADE**

CURITIBA

2015

JÉSSICA DE OLIVEIRA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE  
*BCHE* DA BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA E A OBESIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial à  
obtenção do grau de Bacharel no curso de  
graduação em Biomedicina, Setor de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lupe Furtado Alle

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup>. Luciane Viater Tureck

CURITIBA

2015

“A razão é o passo, o aumento da ciência o caminho e  
o benefício da humanidade é o fim.”

(Thomas Hobbes)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ter me concedido a oportunidade de chegar até aqui, permitindo experiências e conhecimentos enriquecedores muito além do eu imaginava.

À minha professora orientadora, Dr.<sup>a</sup> Lupe Furtado Alle, por me acolher em seu laboratório e ter me iniciado na pesquisa científica, pelo aprendizado constante e disponibilidade de tempo, sempre com boa vontade, carinho e um entusiasmo contagiante.

À minha coorientadora, Dr.<sup>a</sup> Luciane Viater Tureck, pelas preciosas contribuições, conversas e ajuda em todos os momentos que precisei desde que iniciei minhas atividades no laboratório.

A todos os demais integrantes e amigos do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, pela disposição em ajudar sempre que necessário e pela agradável convivência e amizade.

Aos meus pais, Osmar e Luzia, minha profunda gratidão pela educação que me proporcionaram ao longo da vida, pelo incentivo diário e apoio incondicional para a minha formação.

## RESUMO

Obesidade é definida como a presença excessiva de tecido adiposo no organismo com potencial para acarretar sérios problemas à saúde. O interesse para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na sua etiologia cresceu em razão do aumento na prevalência do excesso de peso na população mundial, que já configura como um problema de saúde pública. Pela sua natureza multifatorial, pesquisas recentes mostram que a obesidade pode ser uma condição resultante de uma predisposição genética em um ambiente promotor da doença. Considerando genes relacionados com variáveis associadas à obesidade alguns polimorfismos do gene *BCHE*, que codifica a enzima butirilcolinesterase (BChE), tem sido associados com aspectos metabólicos como níveis de lipídeos plasmáticos e adiposidade. O presente trabalho investigou a associação dos SNPs -116G>A, 1615G>A e 1914A>G com atividade enzimática da BChE e marcadores de obesidade (IMC) e metabolismo lipídico (CT, HDL-C, LDL-C e TG) em mulheres obesas (IMC $\geq$ 30 kg/m<sup>2</sup>) e não obesas (IMC<25 kg/m<sup>2</sup>) provenientes da região Sul do Brasil. A extração de DNA foi realizada pela técnica de *salting-out*. Os SNPs -116G>A e 1615G>A foram genotipados por TaqMan (Applied Biosystems) e o SNP 1914A>G por PCR-RFLP. Atividade da BChE plasmática foi medida utilizando a propioniltiocolina como substrato. Foram encontradas frequências alélicas semelhantes entre obesas e não obesas para os três SNPs estudados ( $p>0,05$ ). O SNP -116G>A apresentou efeito independente sobre atividade da BChE tanto em obesas quanto em não obesas, sendo o alelo A responsável por níveis de atividade enzimática mais baixos. No grupo de obesas, efeito independente do IMC sobre atividade da BChE também foi encontrado. Os SNPs 1615G>A e 1914A>G também exerceram influência na determinação de menor atividade da BChE e menores níveis de TG, entre as obesas, mas apenas o envolvimento do SNP 1615 como fator independente na determinação da atividade da BChE e níveis de TG foi confirmado por análise de regressão ( $-0,189 \pm 0,73$  e  $p=0,01$ ,  $-0,164 \pm 0,078$  e  $p=0,03$ , respectivamente). IMC e atividade da BChE apresentaram efeito independente na determinação dos níveis de TG, sendo a atividade da BChE positivamente correlacionada com os níveis de TG nas obesas. Nossos resultados sugerem que o efeito do polimorfismo 116G>A sobre atividade da BChE independe da condição de obesidade enquanto o polimorfismo 1615G>A apresenta um efeito diferencial sobre atividade enzimática da BChE e níveis de TG em resposta a condição de obesidade.

Palavras-chave: Butirilcolinesterase, variantes do gene *BCHE* e obesidade

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. FORMAS MOLECULARES DA BChE.....	12
Figura 2. DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE <i>BCHE</i> . ....	13

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, E DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DOS SNPS -116G>A , 1615A<G E 1914A>G (% $\pm$ ERRO PADRÃO) EM OBESAS E NÃO OBESAS.....	23
Tabela 2. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS ( $\pm$ ERRO PADRÃO) DOS MARCADORES DE METABOLISMO LIPÍDICO ENTRE OBESAS E NÃO OBESAS.....	23
Tabela 3. COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS ( $\pm$ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ESTRATIFICADA PELOS GENÓTIPOS AGRUPADOS DO POLIMORFISMO -116G>A DO GENE <i>BCHE</i> .....	24
Tabela 4. COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS ( $\pm$ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ESTRATIFICADA PELOS POSSÍVEIS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO 1615G>A DO GENE <i>BCHE</i> .....	25
Tabela 5. COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS ( $\pm$ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ESTRATIFICADA PELOS POSSÍVEIS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO 1914A>G DO GENE <i>BCHE</i> .....	26
Tabela 6. RESULTADO DA ANÁLISE DE REGRESSÃO MULTIPLA.....	27
Tabela 7. COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS (+ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ENTRE HOMOZIGOTAS USUAIS E PORTADORAS DOS ALELOS MENOS FREQUENTES PARA OS SÍTIOS -116G>A, 1615G>A E 1914A>G, CONCOMITANTEMENTE .....	33
Tabela 8. COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS (+ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ENTRE HOMOZIGOTAS USUAIS E PORTADORAS DOS ALELOS MENOS FREQUENTES PARA OS SÍTIOS, 1615G>A E 1914A>G, CONCOMITANTEMENTE .....	33
Tabela 9. COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS (+ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ENTRE HOMOZIGOTAS USUAIS E PORTADORAS DOS ALELOS MENOS FREQUENTES PARA OS SÍTIOS -116G>A E 1914A>G, CONCOMITANTEMENTE .....	34
Tabela 10. COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS (+ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ENTRE HOMOZIGOTAS USUAIS E PORTADORAS DOS ALELOS MENOS FREQUENTES PARA OS SÍTIOS -116G>A E 1615G>A, CONCOMITANTEMENTE .....	34

## LISTA DE SIGLAS

AChE	– Acetilcolinesterase
BChE	– Butirilcolinesterase
<i>BCHE</i>	– Gene da butirilcolinesterase
CT	– Colesterol total
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
DTNB	– Ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetraacético
EHW	– Equilíbrio de Hardy-Weinberg
G1	– Monômero da butirilcolinesterase
G1- ALB	– Monômero da butirilcolinesterase associado à albumina
G2	– Dímero da butirilcolinesterase
G4	– Tetrâmero da butirilcolinesterase
HDL-C	– <i>Density Lipoproteins Cholesterol</i>
IMC	– Índice de massa corporal
LDL-C	– <i>Low Density Lipoproteins Cholesterol</i>
mRNA	– RNA mensageiro
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	– Nucleotídeo
PCR	– <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	– <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNP	– <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TBE	– Tris-ácido bórico-EDTA
TG	– Triglicerídeos
WHO	– <i>World Health Organization</i>



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>2</b>
2.1 Objetivo geral	2
2.2 Objetivos específicos	2
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	<b>3</b>
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
4.1 Obesidade	4
4.1.1 Epidemiologia e definição	4
4.1.2 Avaliação do IMC	5
4.2 Obesidade e genética	8
4.3 Butirilcolinesterase	9
4.3.1 Função no metabolismo lipídico	10
4.3.2 Estrutura bioquímica da BChE humana	11
4.3.3 Gene <i>BCHE</i>	13
4.3.4 Polimorfismos 1615G>A, -116G>A e 1914A>G do gene <i>BCHE</i>	14
4.4 Associação da butirilcolinesterase com obesidade	16
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>19</b>
5.1 Artigo	19
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>35</b>
<b>6 APÊNDICES</b>	<b>43</b>
6.1 Amostragem	43
6.2 Parâmetros investigados	43
6.3 Análise genotípica do gene <i>BCHE</i>	44
6.3.1 Extração de DNA	44
6.3.2 Genotipagem dos polimorfismos -116G>A, 1615G>A e 1914A>G	44
6.3.2.1 Genotipagem <i>TaqMan</i>	45
6.3.2.2 <i>PCR-RFLP</i>	45
6.4 Determinação da atividade enzimática da BChE	46
6.5 Análises estatísticas	47

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento rápido da prevalência da obesidade em diferentes populações a nível mundial representa atualmente um dos principais desafios da saúde pública (WHO). Por se tratar de uma condição sabidamente associada a diversas complicações que elevam a morbimortalidade dos indivíduos obesos, tem-se estimulado a prevenção e a identificação dos fatores envolvidos na etiologia da obesidade (PEREIRA *et al.*, 2003).

Na busca pela compreensão das causas da obesidade os esforços foram naturalmente concentrados nos fatores ambientais em razão das mudanças sociais, econômicas e culturais que alteraram, significativamente, o estilo de vida das pessoas a partir do desenvolvimento industrial e tecnológico. Contudo, as influências externas correlacionam-se com fatores endógenos, determinantes de maior ou menor suscetibilidade para o desenvolvimento de excesso de peso e complicações metabólicas, e diante desse fato, a influência dos fatores genéticos foi percebida como fundamental para o entendimento da relação entre os diversos aspectos da obesidade (STUNKARD *et al.*, 1986; MAES *et al.*, 1997; WADE *et al.*, 2001).

Na pesquisa de genes e regiões cromossômicas relacionadas com variáveis associadas à obesidade, o loco *BCHE*, que codifica uma enzima polimórfica denominada butirilcolinesterase (BChE), configura atualmente um gene candidato envolvido suscetibilidade genética para o desenvolvimento da obesidade (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991; SOUZA *et al.*, 2005; FURTADO-ALLE *et al.*, 2008; BENYAMIN *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2013). Alguns polimorfismos do gene *BCHE* e a atividade da BChE têm sido associados com variáveis antropométricas e bioquímicas, tais como o IMC e os lipídeos plasmáticos (ALCANTARA *et al.*, 2005; BENYAMIN *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2013). Embora, uma função biológica crítica não seja atribuída à BChE, acredita-se que seja sua capacidade de hidrolisar ésteres de colina o elemento responsável pelo seu envolvimento com metabolismo lipídico, e conseqüentemente com variáveis associadas à obesidade (CLITHEROW *et al.*, 1963; CHU *et al.*, 1978; SISKOVA *et al.*, 2012 *apud* LIMA, *et al.*, 2013).

Considerando o possível papel de três sítios polimórficos do gene *BCHE* (-116G>A, 1615G>A e 1914A>G) no metabolismo lipídico, e consequentemente na gênese da obesidade (SOUZA *et al.*, 2005; FURTADO-ALLE *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2013), o presente estudo tem por objetivo investigar o efeito destes três polimorfismos sobre a atividade enzimática da BChE, IMC e perfil lipídico em duas amostras diferentes, compostas por mulheres obesas e não obesas, naturais da região sul do Brasil, verificando portanto possíveis relações específicas no gênero feminino.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar a associação individual e combinada das variantes -116A, 1615A e 1914G do gene *BCHE* com a atividade enzimática da butirilcolinesterase (BChE), e marcadores da obesidade e metabolismo lipídico: IMC (índice de massa corporal), HDL-C (colesterol associado a lipoproteína de baixa densidade), LDL-C (colesterol associado a lipoproteína de alta densidade), CT (colesterol total) e TG (triglicerídeos) em mulheres obesas e não obesas.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Calcular e comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos -116G>A, 1615G>A e 1914A>G do gene *BCHE* entre mulheres obesas ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) e mulheres com peso normal ( $20 \leq IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ).
2. Investigar associação entre a variabilidade detectada nos polimorfismos do gene *BCHE* (-116G>A, 1615G>A e 1914A>G) com marcadores da obesidade, metabolismo lipídico, e atividade da BChE dentro de cada grupo (obesas e não obesas).

### 3 JUSTIFICATIVA

A identificação de polimorfismos genéticos foi facilitada com as tecnologias de genotipagem, permitindo, portanto, a realização de estudos de associação genômica ou de genes candidatos em nível populacional, para tornar mais compreensível o quadro dos componentes herdáveis em problemas de saúde complexos como a obesidade (ANDREASEN e ANDERSEN, 2009).

A obesidade representa atualmente um problema de saúde pública em razão de sua crescente prevalência na população mundial e é uma condição associada com inúmeras complicações que comprometem significativamente a qualidade de vida do indivíduo afetado. Pela sua natureza complexa, em estudos para melhor compreensão de fatores envolvidos na etiologia da obesidade, a influência de fatores genéticos tem despertado grande interesse da comunidade científica e conduzido diversos trabalhos de associação de genes com variáveis metabólicas, uma vez que as estimativas do nível de herdabilidade para essa condição variam de 24% a até mais de 70% (BOUCHARD, 1994; PRICE, 2002; HSU *et al.*, 2005; WARDLE *et al.*, 2008).

Considerando a associação da BChE com obesidade e metabolismo de lipídeos demonstrada em estudos anteriores (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991; ALCÂNTARA *et al.*, 2002; ALCANTARA *et al.*, 2005; BENYAMIN *et al.*, 2011; SCACCHI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; CHAVES *et al.*, 2013; MILANO *et al.*, 2013) tem-se a hipótese de que a atividade da BChE pode ser afetada por uma interação entre variantes de diferentes sítios polimórficos e não apenas por um polimorfismo. Visto a necessidade de mais estudos que abordem o polimorfismo 1914A>G com os sítios polimórficos -116G>A e 1615G>A para elucidar essa possível interação entre variantes, os resultados do presente trabalho poderão contribuir com achados relevantes quanto ao papel dessa enzima, e dos polimorfismos em seu gene codificador no entendimento da suscetibilidade genética de mulheres ao desenvolvimento da obesidade e nos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da adiposidade e do peso corporal.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Obesidade

#### 4.1.1 Epidemiologia e definição

O aumento alarmante na prevalência global da obesidade reflete-se na sua importância como a quinta maior causa de mortes no mundo. Aproximadamente 2,8 milhões de mortes ocorrem a cada ano, mundialmente, por alterações decorrentes do excesso de peso, sendo que 44% dos casos de diabetes e 23% das doenças isquêmicas do coração podem ser relacionadas ao sobrepeso e obesidade (WHO). No Brasil, segundo levantamento da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL 2012) realizado pelo Ministério da Saúde, o sobrepeso foi verificado em 51% da população de adultos (54,5% dos homens e 48,1% das mulheres) e, destes, a obesidade foi diagnosticada em 17,4%. A média de obesidade entre os brasileiros superou a média global, mas ainda continua inferior as estimativas obtidas em países como Bolívia, Reino Unido, Estados Unidos e México (NG *et al.*, 2014).

A obesidade é uma condição crônica caracterizada por um acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo, resultante de um desbalanço energético que favorece a estocagem de gordura (PEREIRA *et al.*, 2003). O excesso de peso e a obesidade representam fatores de risco para a ocorrência de outros problemas de saúde como doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemias, distúrbios musculoesqueléticos, problemas respiratórios, insuficiência renal e alguns tipos de cânceres, além de problemas psico-sociais, que elevam o risco de morte prematura e comprometem a qualidade de vida do indivíduo (SKOLNIK e RYAN, 2014).

#### 4.1.2 Avaliação do IMC

Para avaliar sobrepeso e obesidade em grandes populações, utiliza-se o Índice de Massa Corporal (IMC), expresso em  $\text{kg/m}^2$ . Esse índice é obtido dividindo-se a massa corporal, em quilogramas, pelo quadrado da altura, em metros. De acordo com a Organização Mundial da saúde (WHO), para indivíduos adultos e de ambos os sexos, os valores de IMC maior ou igual a  $25 \text{ kg/m}^2$  são caracterizados como sobrepeso, e maior ou igual a  $30 \text{ kg/m}^2$  como obesidade.

Para alcançar a saúde ideal, a média de IMC indicada para uma população de indivíduos adultos deve estar entre 21 e  $23 \text{ kg/m}^2$ , enquanto que o objetivo entre os indivíduos deve ser manter um IMC entre 18,5 e  $24,9 \text{ kg/m}^2$  (WHO). Apesar de ser um bom indicador, o cálculo do IMC apresenta algumas limitações por não estar totalmente correlacionado com a distribuição de gordura corporal quanto à relação entre massa magra e gordura, de modo que indivíduos diferentes com o mesmo IMC podem não ter o mesmo grau de adiposidade por diferenças nas proporções corporais (GARN *et al.*, 1986; BOUCHARD, 1992). Segundo as Diretrizes Brasileiras De Obesidade (2009), o valor de IMC não reflete, necessariamente, a distribuição da gordura corporal, uma medida importante na avaliação de sobrepeso e obesidade, pois a gordura visceral (intra-abdominal) é um fator de risco potencial para a doença, independentemente da gordura corporal total. Além disso, por não distinguir massa gordurosa de massa magra, possibilita a obtenção de um valor subestimado em indivíduos mais velhos, em decorrência da sua perda de massa magra, e de um valor superestimado em indivíduos musculosos. Em crianças, o IMC também se associa de modo significativo à adiposidade, mas pela variação da corpulência durante o crescimento, a sua interpretação difere de acordo com o sexo e a faixa etária (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE, 2009).

A quantidade de gordura corporal pode ser medida de forma mais precisa se forem consideradas outras formas de avaliação combinadas com a medição do IMC como, por exemplo, parâmetros de circunferência abdominal, relação circunferência abdominal/quadril (RCQ) e espessura de dobras cutâneas (SÖNMEZ *et al.*, 2003).

#### 4.1.3 Tecido adiposo como um órgão dinâmico na regulação metabólica

O tecido adiposo tende a apresentar uma massa relativamente estável nos mamíferos, indicando a existência de mecanismos fisiológicos que regulam a relação entre ingestão e gasto de calorias (PADEZ, 2000 *apud* JÚNIOR *et al.*, 2004).

Os adipócitos são células especializadas no armazenamento de lipídeos por possuírem a maquinaria enzimática necessária para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar triglicerídeos, a partir do excesso de calorias, para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit calórico. Esses processos são regulados por ações neurais diretas e indiretas, como, por exemplo, o comportamento alimentar, e por outros sistemas reguladores, como os sistemas digestório e endócrino, que participam de acordo com as necessidades do momento (AHIMA e FLIER, 2000 *apud* ALANIZ *et al.*, 2007).

Além de seus papéis clássicos como estoque de energia metabólica e de isolante térmico, o tecido adiposo passou a ser considerado um órgão central do controle metabólico (ALANIZ *et al.*, 2007). Com a descoberta da sua capacidade de secretar inúmeras substâncias, chamadas em conjunto de adipocinas, e pela diversidade de receptores que possui, o tecido adiposo destacou-se como órgão endócrino, capaz de atuar em várias vias do metabolismo energético e de responder a sinais hormonais de uma complexa rede de interações que regulam os processos metabólicos (KERSHAW e FLIER, 2004). Pela diversidade de adipocinas já identificadas (por exemplo, leptina, TNF- $\alpha$ , IL-6, resistina, visfatina e adiponectina), assim como de seus efeitos sobre os próprios adipócitos ou sobre outros tecidos do organismo, constata-se que o tecido adiposo coordena uma variedade de processos biológicos como metabolismo energético, funções neuroendócrinas e imunológicas (KERSHAW e FLIER, 2004; ALANIZ *et al.*, 2007) e que, conseqüentemente, passa a ter uma ligação direta com patologias associadas à obesidade (ALANIZ *et al.*, 2007).

A distribuição de gordura corporal é significativamente influenciada pelo gênero, com as mulheres, usualmente, apresentando maior grau de adiposidade que os homens e uma maior razão tecido adiposo subcutâneo/tecido adiposo visceral (TAS/TAV) (ROSENBAUM *et al.*, 2001; GEER e SHEN, 2009). A funcionalidade de cada depósito de gordura também está sujeita a variações regionais.

A gordura visceral está mais intimamente correlacionada com obesidade do que a gordura corporal total mostrando um papel mais relevante nos distúrbios metabólicos (PEIRIS *et al.*, 1988; STOLK *et al.*, 2003; DIPIETRO *et al.*, 1999). Este depósito é metabolicamente mais ativo que o depósito subcutâneo (ARNER *et al.*, 1990; KNIGHTS *et al.*, 2014) e o conjunto de adipocinas secretadas também difere das adipocinas secretadas pela gordura subcutânea, sendo o depósito que mais secreta adipocinas de efeito inflamatório (WAJCHENBERG, 2000).



## 4.2 Obesidade e genética

O principal fator responsável pelo incremento da prevalência da obesidade está relacionado com uma mudança socioeconômica e cultural, que tem favorecido uma dieta hipercalórica e hábitos de vida sedentários devido às facilidades da vida moderna proporcionadas pelo avanço tecnológico (FREITAS *et al.*, 1998; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998 apud PEREIRA *et al.*, 2003). Entretanto, a predisposição genética para o desenvolvimento desse distúrbio fisiológico é um importante fator a ser considerado nesse ambiente “obesogênico”, pois a obesidade comum é uma doença complexa, de caráter multifatorial, que envolve interações entre múltiplos genes e destes com o ambiente (RANKINEN *et al.*, 2002; KOPELMAN, 2000).

Acredita-se que os genes desempenham um papel permissivo no desenvolvimento da obesidade poligênica e que a atuação de fatores ambientais sobre genes de suscetibilidade levem ao fenótipo de obesidade (KOPELMAN, 2000). Diversos estudos apontam que influências genéticas desempenham um papel expressivo nas diferenças individuais de peso corporal e adiposidade (STUNKARD *et al.*, 1986; MAES *et al.*, 1997; WADE *et al.*, 2001). Estima-se que os fatores genéticos possam responder por 24% a 40% da variância no IMC, por determinarem diferenças em fatores como taxa de metabolismo basal, resposta à superalimentação e outras características metabólicas (BOUCHARD, 1994; PRICE, 2002). Outras pesquisas realizadas com gêmeos monozigóticos (idênticos), não idênticos, e irmãos não gêmeos, fornecem forte evidência para a herdabilidade do peso corporal, mostrando que até mais de 70% da variabilidade do peso corporal pode ser atribuída à variação genética dentro da população a qual esses gêmeos pertencem (HSU *et al.*, 2005; WARDLE *et al.*, 2008).

### 4.3 Butirilcolinesterase

As esterases compreendem uma variedade de enzimas capazes de realizar a hidrólise de ligações éster, sendo classificadas de acordo com substrato sobre o qual preferencialmente atuam. As colinesterases são esterases que catalisam, com mais eficiência, a hidrólise de ésteres de colina e são diferenciadas das demais esterases por apresentarem sensibilidade à inibição por fisostigmina na concentração de  $10^{-5}$  M (AUGUSTINSSON, 1963).

No sangue humano existem dois tipos de colinesterases, a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8). Ambas são glicoproteínas e apresentam alto grau de similaridade nas suas sequências de aminoácidos e formas moleculares. Também apresentam atividades catalíticas adicionais, desempenhando funções biológicas mais amplas, como sugere a similaridade com sequências de diferentes esterases, lipases, tiroglobulina e proteínas de adesão celular (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

A AChE atua preferencialmente na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, produzindo acetato e colina, e é encontrada na membrana dos eritrócitos, no plasma, sistema nervoso central, líquido e junções neuromusculares (JOHNSON e MOORE, 2000; VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2013).

A BChE tem como substrato preferencial a butirilcolina e apesar da ausência de uma função fisiológica crítica, esta enzima está envolvida em diversos processos como desintoxicação do organismo, hidrólise de acetilcolina e sequestro de peptídeos ricos em prolina (LOCKRIDGE, 2015). Depois da introdução do bloqueador neuromuscular succinilcolina, em 1950, descobriu-se que alguns indivíduos possuem uma forma hereditária da BChE que é incapaz de hidrolisar a succinilcolina (KALOW, 1962; KALOW e STARON, 1957; LEHMANN e RYAN, 1956 *apud* LOCKRIDGE, 2015), e que mesmo na ausência completa de qualquer BChE ativa os indivíduos são saudáveis (DOENICKE *et al.*, 1963; LIDDELL *et al.*, 1962 *apud* LOCKRIDGE, 2015). Sabe-se que sua capacidade hidrolítica envolve diversos ésteres de colina, bloqueadores neuromusculares e outros compostos como ácido salicílico, cocaína, drogas anticonvulsivantes, organofosfatos e carbamatos (ÇOKUĞRAŞ, 2003). Além de sua função colinesterásica, sugere-se influência da

BChE no desenvolvimento embrionário, na expressão da AChE, que por sua vez está associada com diferenciação e adesão celular na neurogênese (ROBITZKI *et al.*, 1997) e metabolismo de lipídeos (KUTTY, 1980; CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991; ALCÂNTARA *et al.*, 2002; ALCANTARA *et al.*, 2005; LOCKRIDGE, 2015). Suas funções diversas dependem da localização e do tempo em que é expressa (SOREQ e SEIDMAN, 2001).

#### 4.3.1 Função no metabolismo lipídico

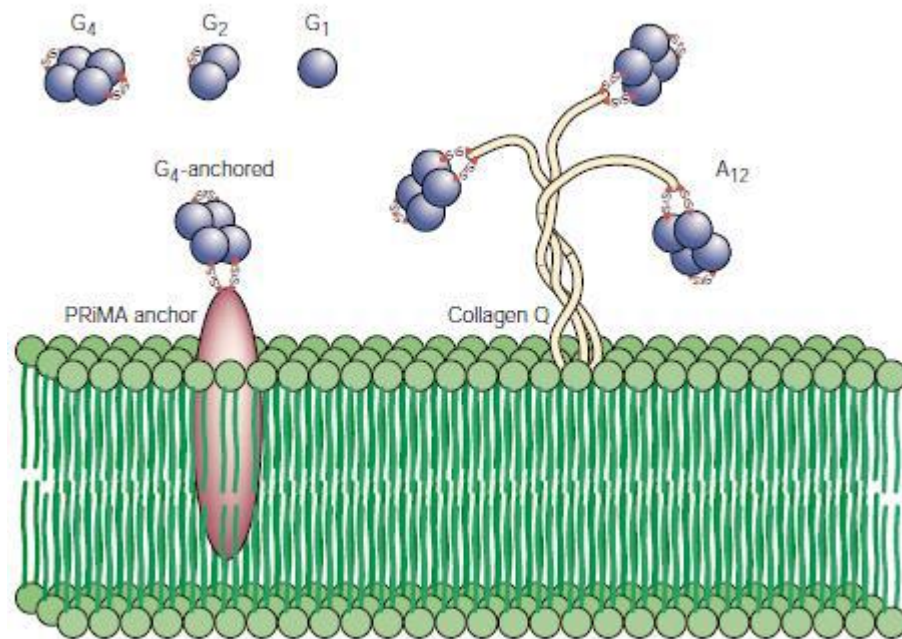
A butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8), também conhecida como colinesterase do soro ou colinesterase não específica, é sintetizada no fígado e no tecido adiposo com ampla distribuição no organismo. Encontra-se no plasma, pâncreas, fígado, pele, músculo liso, endotélio vascular, cérebro e coração (CHATONNET e LOCKIDGE, 1989; WESCOE *et al.*, 1947). A associação da BChE com metabolismo de lipídeos e com fatores ligados a obesidade, como IMC, triglicerídeos e lipoproteínas tem sido abordada em diversos estudos (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991; ALCÂNTARA *et al.*, 2002; ALCANTARA *et al.*, 2005; BENYAMIN *et al.*, 2011; SCACCHI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; CHAVES *et al.*, 2013; MILANO *et al.*, 2013) e, embora seu papel nas vias metabólicas não seja completamente elucidado, propõem-se que sua função nesse contexto seja a hidrólise de ésteres de colina, produtos do metabolismo de ácidos graxos livres e da lipogênese hepática (CHU *et al.*, 1978; CLITHEROW *et al.*, 1963; SISKOVA *et al.*, 2012 *apud* LIMA, *et al.*, 2013).

Além da hidrólise de produtos intermediários do metabolismo de ácidos graxos livre e da lipogênese no fígado, a BChE também desempenha um papel no catabolismo energético via hidrólise da grelina. A grelina é um hormônio peptídico, que na forma acilada, estimula a ingestão alimentar e promove o ganho de peso por diminuir o gasto energético e o catabolismo de gordura. Considerando que é a grelina acilada que está relacionada com aumento de peso e que a BChE plasmática a torna inativa por desacilação, tem-se a hipótese de que a deficiência de BChE está associada com catabolismo de gordura reduzido, dessa forma, favorecendo o desenvolvimento da obesidade (DE VRIESE *et al.*, 2004).

#### 4.3.2 Estrutura bioquímica da BChE humana

A BChE humana pode ser encontrada no organismo em diferentes formas moleculares: monômero ( $C_1$ ), monômero ligado à albumina ( $C_2$ ), dímero ( $C_3$ ), tetrâmero ( $C_4$ ) e tetrâmero ligado a uma molécula desconhecida (HARRIS *et al.*, 1963), sendo os monômeros constituídos por 574 aminoácidos e nove cadeias de oligossacarídeos, com um peso molecular total em torno de 85.534 Da (LOCKRIDGE *et al.*, 1987). No plasma, a BChE consiste de mais de 95% de tetrâmeros (BLONG *et al.*, 1997 *apud* FANG *et al.*, 2014) estáveis na circulação com um tempo de meia-vida de 7 a 12 dias (SUN *et al.*, 2002 *apud* FANG *et al.*, 2014). Os tetrâmeros, com peso molecular de aproximadamente 340 kDa, são formados por um dímero de dímeros, onde cada dímero é constituído por monômeros ligados por uma ponte dissulfeto, e os dímeros que se arranjam na formação do tetrâmetro são unidos por ligações não covalentes (LOCKRIDGE *et al.*, 1987).

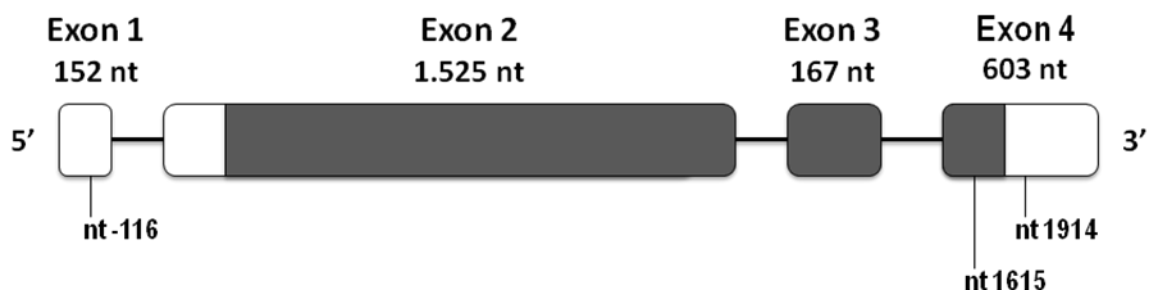
Além da nomenclatura proposta por HARRIS *et al.* (1963), baseada na mobilidade eletroforética de cada banda relativa às formas moleculares da BChE, uma outra nomenclatura foi, posteriormente, sugerida para representar as formas globulares de acordo com o número de subunidades (MASSON, 1989). A forma  $C_1$  corresponde à forma globular monomérica designada  $G_1$ ,  $C_2$  equivale a  $G_1$ -ALB,  $C_3$  é referida como  $G_2$  e  $C_4$  corresponde à  $G_4$ . A denominação  $G_3$  representa um trímero de mobilidade eletroforética intermediária entre  $C_3$  e  $C_4$ . **Na figura 1**, são demonstradas as formas moleculares BChE e possíveis variações.



**Figura 1. FORMAS MOLECULARES DA BChE.** G1: forma globular solúvel monomérica; G2: forma globular solúvel dimérica; G4: forma globular solúvel tetramérica. A forma G4-ancorada é um tetrâmero ligado a membrana através da interação com PRiMA (âncora rica em prolina). A12 é uma forma assimétrica em que três tetrâmeros estão ligados à membrana por uma tripla hélice de colágeno Q. fonte: DARVESH *et al.*, 2003.

#### 4.3.3 Gene *BCHE*

A BChE é uma enzima polimórfica codificada pelo loco *BCHE*, localizado no braço longo do cromossomo 3 entre as posições 26.1-q26.2 (ARPAGAUSS *et al.*, 1990). O loco *BCHE* tem 64.562 pares de bases e apresenta quatro exons, sendo o exon 1 não traduzido na proteína madura, assim como a parte inicial do exon 2 e a parte final do exon 4 (NCBI, acessado em 29/10/2014) (**Figura 2**). O exon 1 (152 nucleotídeos), além de formar a sequência 5' não traduzida no RNAm apresenta dois potenciais sítios de início da tradução nos códons -69 e -47. O exon 2 (1.525 nucleotídeos) apresenta o primeiro nucleotídeo que codifica para o peptídeo maduro e contém 83% da sequência codificadora da BChE, incluindo a extremidade N-terminal da proteína e um terceiro possível sítio de início da tradução no códon -28. O exon 3 possui 167 nucleotídeos, que fazem parte da proteína madura. O exon 4 (603 nucleotídeos) codifica a extremidade C-terminal da enzima e forma a sequência 3' não traduzida que apresenta dois sítios de poliadenilação. O intron 1-2 tem 6.276 nucleotídeos, o intron 2-3 tem 43.205 nucleotídeos e o intron 3-4 possui 12.638 nucleotídeos. A sequência codificadora possui 1.809 nucleotídeos traduzidos em 602 aminoácidos, sendo 84 nucleotídeos codificantes para uma sequência peptídica sinalizadora composta por 28 aminoácidos e 1.722 nucleotídeos codificadores dos 574 aminoácidos correspondentes a cadeia polipeptídica da BChE (NCBI, acessado em 29/10/2014).



**Figura 2. DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE *BCHE*.** Os exons são mostrados como retângulos acompanhados do número de pares de bases que os compõem. A região sombreada em cinza corresponde à sequência codificadora da cadeia polipeptídica da BChE madura. A localização dos três sítios polimórficos estudados neste trabalho também está indicada na figura. FONTE: Adaptado de PARNAS *et al.*, 2011.

Não há formas de *splicing* alternativo para a BChE humana. A forma solúvel, globular tetramérica no plasma bem como as formas ligadas à membrana, no músculo e no cérebro, são codificadas pelo mesmo mRNA (MASSOULIE, 2002 *apud* LOCKRIDGE, 2014).

A região promotora e o sítio de início da transcrição do gene *BCHE* foram elucidados por Jbilo et al. (1994), que analisaram a região regulatória a montante da sequência codificadora e encontram um sítio de início da transcrição localizado a 157 nucleotídeos a montante do sítio de início da síntese proteica (Met<sup>-28</sup>). As sequências próximas ao sítio de iniciação da transcrição do gene *BCHE* apresentam homologia com fatores de iniciação observados em genes sem TATA Box, que são regulados durante o desenvolvimento (JBILO et al., 1994). Sítios de ligação para elementos regulatórios da região promotora também foram encontrados, incluindo sítios de ligação para fatores de transcrição como AP1, Oct-1 (proteína ligadora de octâmero), PEA-3 e topoisomerase (JBILO et al., 1994; WASYLYK et al., 1990). É possível que a expressão do gene *BCHE* também seja regulada a nível traducional por microRNAs como foi sugerido por Hanin e Soreq (2011). Os autores relatam que a região 3' UTR do gene *BCHE* é alvo de pelo menos 116 microRNAs que podem estar atuando como silenciadores do mRNA do gene *BCHE*.

#### 4.3.4 Polimorfismos 1615G>A, -116G>A e 1914A>G do gene BCHE

Já foram descritas mais de setenta variantes para o gene *BCHE* (revisão em SOUZA et al., 2005 *apud* BOBERG et al., 2010) e estudos de associação com variáveis metabólicas abordam, especialmente, variantes de três sítios polimórficos, nos nucleotídeos -116, 1615 e 1914 (FURTADO-ALLE et al., 2008; SOUZA et al., 2005; LIMA et al., 2013).

A variante 1615A (variante K) é a variante genética mais frequente da região codificadora do exon 4. Foi apresentada, originalmente, com uma frequência de 13% em população norte-americana (BARTELS et al., 1990) e pode ser encontrada em 18% da população brasileira (SOUZA et al., 1998). Há um polimorfismo de nucleotídeo simples, com a substituição de **GCA** para **ACA** no nucleotídeo 1615 (1615G>A), que acarreta a troca de Alanina por Treonina no códon 539 (A539T),

resultando na enzima conhecida como *variante K* (BARTELS *et al.*, 1992). Em relação à forma usual da BChE, Rubinstein *et al.* (1978) constataram que essa variante possui uma concentração plasmática 33% menor e Podoly *et al.* (2009) sugerem que uma mudança estrutural determinada pela presença da *variante K* na região C-terminal da enzima, importante para na tetramerização, leva a uma redução na sua atividade hidrolítica devido a uma instabilidade causada pela substituição de A539T.

O polimorfismo -116G>A ocorre fora da região codificadora da enzima e está localizado no exon 1 do gene, consiste na troca de G para A no nucleotídeo -116. O alelo -116A foi descrito, originalmente, com uma frequência de 8% na população norte-americana (BARTELS *et al.*, 1990) e é encontrada com frequência semelhante em população euro-brasileira (FURTADO-ALLE *et al.*, 2008). O estudo de Furtado-Alle *et al.* (2008) identificou que a reduzida atividade da BChE, antes atribuída a presença da variante 1615A, deve-se a presença conjunta da 1615A com a -116A, pois a presença apenas do alelo 1615A não alterou significativamente a atividade da BChE. Os autores sugerem que a presença da variante -116A interfira na ligação de elementos reguladores no processo de transcrição ou tradução do gene *BCHE*, pois essa variante encontra-se na região 5' UTR do mRNA.

A variante 1914G também ocorre fora da região codificadora do gene *BCHE*, a 189 nucleotídeos depois do códon de término da tradução no exon 4, e está relacionada com uma alteração de A para G no nucleotídeo 1914 (1914A>G). É encontrada com uma frequência de 26% em população norte-americana (BARTELS *et al.*, 1990). Os autores que descreveram os três polimorfismos citados também constataram que as três variantes, 1615A, -116A e 1914G, encontram-se em desequilíbrio de ligação sendo, preferencialmente, encontradas em configuração *cis* (BARTELS *et al.*, 1990).



#### 4.4 Associação da butirilcolinesterase com obesidade

A hipótese de que polimorfismos no gene *BCHE* estejam entre os fatores genéticos de suscetibilidade para obesidade, por meio de seu envolvimento com metabolismo lipídico, tem sido evidenciada por uma série de estudos que encontraram correlação positiva de variantes do gene *BCHE* e da atividade da butirilcolinesterase com peso, IMC e lipídeos plasmáticos (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991; ALCÂNTARA *et al.*, 2002; ALCANTARA *et al.*, 2005; BENYAMIN *et al.*, 2011; SCACCHI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; CHAVES *et al.*, 2013; MILANO *et al.*, 2013).

O tecido adiposo apresenta uma concentração de BChE de aproximadamente 40 a 50% dos níveis encontrados no fígado (ANNAPURNA *et al.*, 1991) e o potencial envolvimento da BChE no metabolismo lipídico do tecido adiposo poderia afetar o perfil lipídico. Consistente com essa hipótese, relata-se que a administração de iso-OMPA (tetraisopropilpirofosforamida), um inibidor específico da BChE, causa uma redução significativa de triglicerídeos, LDL e peso corporal (ANNAPURNA *et al.*, 1991). Esses dados dão sustentação ao papel da BChE na regulação do perfil de lipídeos séricos e acúmulo de gordura, mas os mecanismos subjacentes a regulação do perfil lipídico e adiposidade pela BChE permanecem incertos.

Analizando a possível influência da mutação 1615G>A sobre o IMC, em doadores de sangue de Curitiba, Souza *et al.* (2005) verificaram que as variantes desse sítio afetam diferentemente a variância do IMC, que foi significativamente maior nos indivíduos com genótipo 1615AG em relação ao genótipo 1615GG.

Investigando associação do polimorfismo -116G>A com IMC e atividade enzimática da BChE, Furtado-Alle *et al.* (2008) observaram que maior variância de IMC ocorre apenas na presença concomitante da variante 1615A com a variante -116A, e que o decréscimo na atividade enzimática, inicialmente atribuída ao alelo 1615A, também está associada com a presença concomitante do alelo -116A. No mesmo trabalho também se observou que a atividade reduzida da BChE em decorrência da mutação -116A ocorre tanto em indivíduos obesos, quanto em não obesos, embora indivíduos obesos tendem a apresentar maiores valores da atividade da BChE (ALCANTARA *et al.*, 2005; RANDELL *et al.*, 2005).

A maior atividade da BChE em indivíduos obesos que em indivíduos com peso normal também foi demonstrada por BOBERG *et al.* (2010) ao avaliar a atividade das diferentes formas moleculares da BChE plasmática. Estudos anteriores sugerem que a atividade aumentada da BChE em obesos seja resultado do aumento dos níveis de ésteres de colina (seu substrato), que são produtos do metabolismo de ácidos graxos livres e da lipogênese no fígado, condições metabólicas estas associadas a obesidade (ALCANTARA *et al.*, 2005; RANDELL *et al.*, 2005; FURTADO-ALLE *et al.*, 2008). Um estudo de Milano *et al.* (2013), que avaliou o efeito da atividade física em fatores de risco para doenças cardiovasculares e atividade da BChE em adolescentes obesos, reforça essa hipótese ao mostrar que a prática de exercícios físicos além de reduzir os fatores de risco também diminui a atividade enzimática da BChE, o que sugere que a atividade desta enzima pode ser utilizada como marcador secundário para os riscos associados à obesidade, inclusive à obesidade precoce.

Kálmán *et al.*, (2004) sugerem que a alteração na atividade da BChE nos indivíduos obesos aconteça por consequência de mudanças estruturais na enzima, devido a hiperlipidemia, ou, que esteja ocorrendo super-expressão do gene *BCHE* devido a hiperlipidemia.

A relação do polimorfismo 1914A>G com IMC, níveis de triglicerídeos séricos e atividade enzimática foi estudada por LIMA *et al.* (2013), que encontraram correlação positiva da variante 1914G com IMC, triglicerídeos e atividade enzimática reduzida. Nesse estudo a variante 1914G mostrou-se mais frequente entre os indivíduos obesos, e os indivíduos portadores desse alelo apresentaram menor atividade da BChE em comparação aos indivíduos com genótipo 1914AA. Ao comparar indivíduos portadores das variantes 1914G e -116A (alelos menos frequentes para ambos os sítios), com indivíduos de genótipo -116GG/1914AA (homozigotos usuais para ambos os sítios), verificou-se maior concentração plasmática de triglicerídeos (LIMA *et al.*, 2013).

É possível que o decréscimo da atividade enzimática da BChE, atribuída a variante -116A, seja decorrente da presença concomitante da variante 1914G, devido ao fato de que a variante 1914G é mais frequente e apresenta desequilíbrio de ligação com o sítio -116. Segundo Lima *et al.*, 2013 a mutação 1914A>G parece

afetar de forma fundamental a atividade da butirilcolinesterase e variáveis associadas à obesidade, e considerando a necessidade de maiores estudos sobre variantes desse sítio polimórfico acredita-se que a atividade da BChE seja afetada por uma interação entre variantes e não apenas por um polimorfismo (LIMA *et al.*, 2013).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Artigo

#### **Associação dos SNPs -116G>A, 1615G>A e 1914A>G do gene *BCHE* com atividade da BChE e marcadores de metabolismo lipídico em mulheres**

*Laboratório de Polimorfismos e Ligação, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.*

#### **RESUMO**

Polimorfismos e atividade da butirilcolinesterase tem sido associados com aspectos metabólicos relacionadas à obesidade, tais como níveis de lipídeos plasmáticos e IMC. O presente trabalho investigou a associação dos SNPs -116G>A, 1615G>A e 1914A>G (rs1126680, rs1803274 e rs3495, respectivamente) com atividade enzimática da BChE e marcadores de obesidade (IMC) e metabolismo lipídico (CT, HDL-C, LDL-C e TG) em mulheres obesas (IMC $\geq$ 30) e não obesas (IMC<25). Foram encontradas frequências alélicas semelhantes entre obesas e não obesas para os três SNPs estudados ( $p>0,05$ ). O SNP -116G>A apresentou efeito independente sobre atividade da BChE tanto em obesas quanto em não obesas, sendo o alelo A responsável por níveis de atividade enzimática mais baixos. No grupo de obesas, efeito independente do IMC sobre atividade da BChE também foi encontrado. Os SNPs 1615G>A e 1914A>G também exerceram influência na determinação de menor atividade da BChE e menores níveis de TG, entre as obesas, mas apenas o envolvimento do SNP 1615G>A como fator independente na determinação da atividade da BChE e níveis de TG foi confirmado. IMC e atividade da BChE apresentaram efeito independente na determinação dos níveis de TG, sendo a atividade da BChE positivamente correlacionada com os níveis de TG nas obesas. Nossos resultados sugerem que o efeito do polimorfismo 116G>A sobre atividade da BChE independe da condição de obesidade enquanto o polimorfismo 1615G>A apresenta um efeito diferencial sobre atividade enzimática da BChE e níveis de TG em resposta a condição de obesidade.

Palavras-chave: gene *BCHE*, obesidade, metabolismo lipídico.

## INTRODUÇÃO

A enzima butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8), codificada pelo loco *BCHE* (26.1-q26.2), é uma colinesterase sintetizada no fígado e no tecido adiposo com ampla distribuição pelo organismo, sendo encontrada no plasma, pâncreas, fígado, pele, músculo liso, endotélio vascular, cérebro e coração (CHATONNET e LOCKIDGE, 1989; WESCOE *et al.*, 1947). Embora, seu substrato natural e seu papel nas vias metabólicas não sejam completamente conhecidos alguns polimorfismos do gene *BCHE* e atividade da BChE tem sido associados com metabolismo de lipídeos e fatores ligados à obesidade tais como peso, IMC e perfil lipídico (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991; ALCÂNTARA *et al.*, 2002; ALCANTARA *et al.*, 2005; BENYAMIN *et al.*, 2011; SCACCHI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; CHAVES *et al.*, 2013; MILANO *et al.*, 2013).

Neste estudo foram considerados três SNPs do gene *BCHE*, -116G>A, 1615G>A (*variante K*; *p. A539T*) e 1914A>G (rs1803274, rs1126680 e rs3495, respectivamente) que ocorrem em desequilíbrio de ligação. As variantes -116A e 1615A, quando presentes de forma concomitante, foram associadas com maior variância no IMC e redução na atividade da BChE (FURTADO-ALLE *et al.*, 2008). A variante 1914G também foi positivamente correlacionada com IMC e decréscimo na atividade da BChE, e ao ser analisada com a presença concomitante da variante -116A foi associada com maior concentração plasmática de triglicerídeos (LIMA *et al.*, 2013).

Considerando o possível papel deste três sítios polimórficos do gene *BCHE* (-116G>A, 1615G>A e 1914A>G) no metabolismo lipídico, e consequentemente na gênese da obesidade, investigamos a associação individual e combinada das variantes -116A, 1615A e 1914G sobre a atividade enzimática da BChE e marcadores de metabolismo lipídico em mulheres obesas e não obesas, naturais da região sul do Brasil, verificando portanto possíveis relações destas variantes no gênero feminino.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostra

A amostra foi composta por 356 mulheres adultas, euro-brasileira provenientes do Sul do Brasil, das quais 264 são obesas ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ ) e 92 não obesas ( $\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$ ). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná.

### Análise de DNA e plasma

O DNA foi extraído pelo método de salting-out (LAHIRI e NURNMERGER, 1991) e diluído para concentrações finais de 20 e 100 ng/ $\mu\text{L}$  para genotipagem *TaqMan* e PCR-RFLP, respectivamente. A genotipagem de variantes alélicas dos sítios -116G>A e 1615G>A (rs1803274 e rs1126680, respectivamente) do gene *BCHE* foram obtidas pelo ensaio de discriminação alélica *TaqMan* (Applied Biosystems) utilizando equipamento ViiA 7 Real-Time PCR System da Applied Biosystems de acordo com os seguintes passos: (1) 50°C / 2 min., (2) 95°C / min., (3) repetir 50 vezes 95°C / 15 seg. intercalado por 62°C / min., (4) 60°C / min.

A PCR-RFLP para genotipagem de variantes do sítio 1914A>G (rs3495) do gene *BCHE* usou o seguinte par de *primers*: 5'AGCAAGAAAGAAAGTTGTGTGGGTCT3' e 3'AGCAGAGCACTGTAATTTTGGGGG5'. Os ciclos de amplificação foram: (1) 95°C / 30 seg., (2) 95°C / 30 seg., (3) 55°C / 30 seg., (4) 72°C / 30 seg., (5) repetir 35 vezes do passo 2 ao 4, (6) 72°C / 10 min. Após amplificação, o DNA foi submetido a restrição pela enzima *XceI* (NspI) (*Thermo Scientific*), com protocolo estabelecido de acordo com recomendações estabelecidas pelo fabricante. O sítio de restrição reconhecido pela enzima encontra-se no alelo 1914A, que ao ser clivado origina dois fragmentos. Para a reação de digestão enzimática foram acrescentados 10  $\mu\text{L}$  de óleo mineral para evitar evaporação durante a incubação por 15 horas a 37 °C. Os fragmentos gerados pela clivagem foram analisados por eletroforese (250V, 35mA e 60W por 90 min.) em gel de poliácridamida (TBE 1X, concentração de poliácridamida a 8% e solução estoque de 29:1) seguida por coloração com nitrato de prata.

A atividade da BChE plasmática foi mensurada utilizando-se propioniltiocolina como substrato a 25 °C (Dietz et al., 1972). Os níveis de colesterol total (mg/dL), colesterol HDL (mg/dL), colesterol LDL (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL) foram obtidos por métodos automatizados.

### **Análise estatística**

Frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta, e a comparação entre grupos foi realizada pelo teste de  $\chi^2$ , assim como o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para testar a normalidade da distribuição das variáveis analisadas foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors. As comparações entre médias foram feitas por teste-t, para as variáveis com distribuição paramétrica, e por teste de Mann-Whitney para variáveis com distribuição não paramétrica. Análises de regressão múltipla foram também utilizadas para averiguar o possível efeito de cada variável independente sobre a variável dependente em questão. A análise de correlação de Spearman (para variáveis não paramétricas) foi aplicada para verificar a inter-relação entre as variáveis. Os resultados dos testes foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (5%). Os genótipos heterozigoto e homozigoto menos frequente para o SNP -116A foram analisados de forma agrupada (AG+AA), devido à baixa frequência do alelo A, enquanto que para os demais SNPs investigados neste estudo as análises foram realizadas com os três genótipos separadamente.

## **RESULTADOS**

As frequências alélicas e genotípicas dos SNPs investigados em obesas e não obesas estão demonstrados na **Tabela 1**, bem como a comparação das frequências alélicas entre estes grupos. O resultado desta comparação demonstrou que os alelos estão igualmente distribuídos entre obesas e não obesas ( $p > 0,05$ ). As frequências genotípicas encontradas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.** COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, E DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DOS SNPS -116G>A , 1615A<G E 1914A>G (%  $\pm$  ERRO PADRÃO) EM OBESAS E NÃO OBESAS

SNP -116G>A						
Grupos	Frequências alélicas		p*	Frequências genotípicas		
	A	G		GG	AG	AA
Obesas	8% ± 1,2	92% ± 1,2	0,777	84,3% (n = 215)	14,5% (n = 37)	1,2% (n = 3)
Não obesas	7,7% ± 2,0	92,3% ± 2,0		84,5% (n = 71)	15,5% (n = 13)	0% (n = 0)
SNP 1615G>A						
Grupos	Frequências alélicas		p*	Frequências genotípicas		
	A	G		GG	AG	AA
Obesas	19% ± 1,8	81% ± 1,8	0,591	64,3% (n = 160)	32,9% (n = 82)	2,8% (n = 7)
Não obesas	21% ± 3,0	79% ± 3,0		64,7% (n = 55)	28,2% (n = 24)	7,1% (n = 6)
SNP 1914A>G						
Grupos	Frequências alélicas		p*	Frequências genotípicas		
	A	G		AA	AG	GG
Obesas	64% ± 2,2	36% ± 2,2	0,833	42,3% (n = 99)	43,2% (n = 101)	14,5% (n = 34)
Não obesas	63% ± 4,0	37% ± 4,0		45,7% (n = 37)	34,6% (n = 28)	19,8% (n = 16)

\* comparação das frequências alélicas entre os grupos.

Independentemente do genótipo dos SNPs estudados, o grupo composto por mulheres não obesas apresentou níveis médios dos marcadores de metabolismo lipídico e atividade da BChE semelhantes ao grupo composto por mulheres obesas ( $p > 0,05$ ), com exceção do nível médio de triglicerídeos que foi maior entre as obesas comparadas as não obesas ( $p = 0,001$ ) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS ( $\pm$  ERRO PADRÃO) DOS MARCADORES DE METABOLISMO LIPÍDICO ENTRE OBESAS E NÃO OBESAS

Parâmetro	Obesas		Não obesas		p
	Média	N	Média	N	
Atividade da BChE (kU/L)	5,19 $\pm$ 0,11	259	5,17 $\pm$ 0,20	90	0,586
HDL-C (mg/dL)	51,38 $\pm$ 0,87	242	53,17 $\pm$ 1,69	72	0,421
LDL-C (mg/dL)	115,24 $\pm$ 1,94	241	117,10 $\pm$ 4,04	74	0,320
TG (mg/dL)	142,22 $\pm$ 4,54	242	105,36 $\pm$ 6,50	74	<b>0,001</b>
CT (mg/dL)	195,10 $\pm$ 2,30	242	188,38 $\pm$ 5,80	74	0,202

Nota: Obesas: IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>; Não obesas: IMC  $< 25$  kg/m<sup>2</sup>; Valores significativos são indicados em negrito.



Comparando as médias dos parâmetros analisados dentro de cada grupo (obesas e não obesas), considerando os genótipos dos SNPs estudados, encontramos que entre as mulheres não obesas apenas o genótipo do SNP -116G>A apresentou efeito, sendo que as portadoras do alelo -116A apresentaram atividade média da BChE significativamente menor comparadas com as não portadoras (-116/GG) ( $p = 0,045$ ) (**Tabela 3**).

Já entre as mulheres obesas foi possível observar efeito dos três polimorfismos investigados, sendo que o SNP -116G>A atuou somente sobre os níveis médios da atividade da BChE, e os SNPs 1615G>A e 1914A>G atuaram sobre esta variável, e também sobre o nível médio de triglicerídeos.

As portadoras obesas do alelo -116A também apresentaram atividade média da BChE significativamente menor comparadas as não portadoras (-116/GG) ( $p=0,000$ ) (**Tabela 3**). O genótipo heterozigoto dos polimorfismos 1615G>A e 1914A>G (AG) conferiu as suas portadoras atividade média da BChE menor ( $p=0,001$  e  $p=0,008$  respectivamente), quando comparado as portadoras do genótipo homozigoto comum (1615/GG) (**Tabela 4**), e homozigoto raro (1914/GG) destes SNPs (**Tabela 5**).

Já o genótipo homozigoto raro dos SNPs 1615G>A e 1914A>G conferiu as suas portadoras obesas menores níveis de triglicerídeos ( $p=0,015$  e  $0,006$  respectivamente), comparados aos genótipos homozigoto comum destes SNPs (GG e AA respectivamente) (**Tabelas 4 e 5** respectivamente).

**Tabela 3.** COMPARAÇÃO ( $p$ ) DAS MÉDIAS ( $\pm$  ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ESTRATIFICADA PELOS GENÓTIPOS AGRUPADOS DO POLIMORFISMO -116G>A DO GENE *BChE*

Parâmetro	Obesas			Não obesas		
	GG (n = 195)*	AG + AA (n = 37)*	p	GG (n = 63)*	AG + AA (n = 10)*	p
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	35,39 $\pm$ 0,38	34,32 $\pm$ 0,67	0,522	22,27 $\pm$ 0,23	22,04 $\pm$ 0,54	0,652
Atividade da BChE (kU/L)	5,37 $\pm$ 0,12	4,32 $\pm$ 0,25	<b>0,000</b>	5,40 $\pm$ 0,24	4,19 $\pm$ 0,44	<b>0,045</b>
HDL-C (mg/dL)	50,55 $\pm$ 0,89	52,3 $\pm$ 2,32	0,580	53,77 $\pm$ 1,86	50,4 $\pm$ 4,34	0,337
LDL-C (mg/dL)	114,39 $\pm$ 2,18	119,67 $\pm$ 4,93	0,310	118,62 $\pm$ 4,62	106,3 $\pm$ 5,71	0,144
TG (mg/dL)	144,26 $\pm$ 5,31	124,57 $\pm$ 8,31	0,118	101,46 $\pm$ 6,36	120,9 $\pm$ 25,43	0,804
CT (mg/dL)	193,85 $\pm$ 2,57	196,86 $\pm$ 5,85	0,639	189,35 $\pm$ 6,65	179,9 $\pm$ 9,35	0,584

Nota: \*N referente ao IMC para obesas foi: GG (n = 158), AG + AA (n = 24); \*N referente a atividade da BChE para obesas foi: GG (n = 210); \*N referente ao IMC para não obesas foi: GG (n = 71); N referente a atividade da BChE para não obesas foi: GG (n = 69). Valores significativos são indicados em negrito.

**Tabela 4.** COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS ( $\pm$  ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ESTRATIFICADA PELOS POSSÍVEIS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO 1615G>A DO GENE *BCHE*

Parâmetro	Obesas					Não obesas				
	GG <sup>A</sup> (n = 146)*	AG <sup>B</sup> (n = 74)*	AA <sup>C</sup> (n = 7)	Comparação	p	GG <sup>A</sup> (n = 50)*	AG <sup>B</sup> (n = 19)*	AA <sup>C</sup> (n = 6)	Comparação	p
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	35,05 $\pm$ 0,42	35,72 $\pm$ 0,60	34,56 $\pm$ 2,09	AxB	0,288	22,11 $\pm$ 0,27	22,52 $\pm$ 0,37	22,51 $\pm$ 0,74	AxB	0,335
				AxC	0,705				AxC	0,725
				BxC	0,316				BxC	0,938
Atividade da BChE (kU/L)	5,46 $\pm$ 0,15	4,73 $\pm$ 0,16	5,65 $\pm$ 1,15	AxB	<b>0,001</b>	5,40 $\pm$ 0,28	5,03 $\pm$ 0,33	4,22 $\pm$ 0,87	AxB	0,644
				AxC	0,975				AxC	0,254
				BxC	0,422				BxC	0,312
HDL-C (mg/dL)	51,76 $\pm$ 1,11	49,55 $\pm$ 1,32	51,43 $\pm$ 5,65	AxB	0,456	53,18 $\pm$ 2,07	52,94 $\pm$ 3,33	53,80 $\pm$ 7,44	AxB	0,702
				AxC	0,766				AxC	0,929
				BxC	0,807				BxC	0,852
LDL-C (mg/dL)	114,42 $\pm$ 2,63	116,44 $\pm$ 3,39	124,73 $\pm$ 8,10	AxB	0,625	119,80 $\pm$ 4,96	110,35 $\pm$ 8,54	115,76 $\pm$ 8,68	AxB	0,424
				AxC	0,257				AxC	0,703
				BxC	0,330				BxC	0,776
TG (mg/dL)	148,90 $\pm$ 6,54	130,59 $\pm$ 6,38	95,57 $\pm$ 8,52	AxB	0,095	99,98 $\pm$ 6,89	105,84 $\pm$ 14,24	157,40 $\pm$ 36,98	AxB	0,788
				AxC	<b>0,015</b>				AxC	0,160
				BxC	0,063				BxC	0,255
CT (mg/dL)	196,07 $\pm$ 3,07	192,01 $\pm$ 3,99	195,28 $\pm$ 10,83	AxB	0,432	189,86 $\pm$ 7,00	181,16 $\pm$ 13,15	201 $\pm$ 6,70	AxB	0,535
				AxC	0,956				AxC	0,621
				BxC	0,808				BxC	0,458

*Nota:* A corresponde ao genótipo GG, B ao genótipo AG e C ao genótipo AA; \*N referente ao IMC para obesas foi: GG (n = 118), AG (n = 58); \*N referente a atividade da BChE para obesas foi: GG (n = 156), AG (n = 82); \*N referente ao IMC para não obesas foi: GG (n = 55), AG (n = 24); Valores significativos são indicados em negrito.

**Tabela 5.** COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS ( $\pm$  ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ESTRATIFICADA PELOS POSSÍVEIS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO 1914A>G DO GENE *BCHE*

Parâmetro	Obesas					Não obesas				
	AA <sup>A</sup> (n = 94)*	AG <sup>B</sup> (n = 91)*	GG <sup>C</sup> (n = 28)**	Comparação	P	AA <sup>A</sup> (n = 36)	AG <sup>B</sup> (n = 24)	GG <sup>C</sup> (n = 13)	Comparação	p
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	35,36 $\pm$ 0,57	35,71 $\pm$ 0,60	34,07 $\pm$ 0,65	AxB	0,445	22,04 $\pm$ 0,33	22,41 $\pm$ 0,35	22,19 $\pm$ 0,42	AxB	0,474
				AxC	0,357				AxC	0,892
				BxC	0,139				BxC	0,751
Atividade da BChE (kU/L)	5,25 $\pm$ 0,17	4,89 $\pm$ 0,15	5,80 $\pm$ 0,14	AxB	0,138	5,11 $\pm$ 0,32	5,79 $\pm$ 0,44	4,78 $\pm$ 0,36	AxB	0,224
				AxC	0,090				AxC	0,937
				BxC	<b>0,008</b>				BxC	0,309
HDL-C (mg/dL)	52,44 $\pm$ 1,39	49,99 $\pm$ 1,32	49,53 $\pm$ 2,00	AxB	0,273	53,94 $\pm$ 2,58	50,48 $\pm$ 2,76	57 $\pm$ 4,55	AxB	0,362
				AxC	0,313				AxC	0,661
				BxC	0,945				BxC	0,313
LDL-C (mg/dL)	112,57 $\pm$ 3,20	115,72 $\pm$ 3,24	121,19 $\pm$ 5,86	AxB	0,392	121,62 $\pm$ 5,66	113,14 $\pm$ 7,45	108,06 $\pm$ 10,77	AxB	0,676
				AxC	0,178				AxC	0,584
				BxC	0,351				BxC	0,703
TG (mg/dL)	147,16 $\pm$ 6,55	143,02 $\pm$ 8,90	117,18 $\pm$ 10,5	AxB	0,214	98,06 $\pm$ 8,34	105,75 $\pm$ 10,54	106,23 $\pm$ 18,78	AxB	0,407
				AxC	<b>0,006</b>				AxC	0,669
				BxC	0,076				BxC	0,750
CT (mg/dL)	194,24 $\pm$ 3,60	194,58 $\pm$ 4,04	194,21 $\pm$ 6,65	AxB	0,950	192,12 $\pm$ 7,53	182,29 $\pm$ 10,92	181,92 $\pm$ 17,20	AxB	0,447
				AxC	0,997				AxC	0,530
				BxC	0,964				BxC	0,985

*Nota:* A corresponde ao genótipo AA, B ao genótipo AG e C ao genótipo GG; \*N referente ao IMC para obesas foi: AA (n = 79), AG (n = 66); \*\*N referente a atividade da BChE para obesas foi: AA (n = 79), AG (n = 66), GG (n = 33); Valores significativos são indicados em negrito.

A análise de regressão múltipla confirmou o efeito independente do SNP -116G>A sobre a atividade média da BChE entre as mulheres não obesas ( $p=0,048$ ), enquanto que o efeito independente do IMC sobre esta variável não foi confirmado ( $p=0,108$ ) nestas mulheres (**Tabela 6**).

Entre as mulheres obesas, a análise de regressão múltipla confirmou o efeito independente dos SNPs -116G>A e 1615G>A ( $p=0,03$  e  $p=0,01$  respectivamente) e do IMC ( $p=0,049$ ) na atividade média da BChE. O efeito independente do SNP 1914A>G não foi confirmado ( $p=0,382$ ).

A análise de regressão múltipla confirmou ainda que entre as mulheres obesas o IMC, o polimorfismo 1615G>A, e a atividade da BChE atuaram de forma independente sobre os níveis de triglicerídeos ( $p=0,049$ ;  $p=0,037$ ;  $p=0,005$  respectivamente), sendo que o polimorfismo 1914A>G também não foi confirmado como fator independente na determinação dos níveis de TG (**Tabela 6**). Através da análise de correlação de Spearman foi encontrada correlação significativa e positiva entre os níveis de atividade enzimática da BChE e os níveis de TG nas mulheres obesas ( $p=0,1726$   $p=0,0076$ ).

**Tabela 6.** RESULTADO DA ANALISE DE REGRESSÃO MULTIPLA

Grupo	Variável dependente	Variáveis independentes consideradas	Variável independente confirmada	$\beta \pm$ erro padrão	p
Controle	Atividade BChE	IMC, -116G>A, 1615G>A e 1914A>G	-116G>A	$-0,218 \pm 0,108$	0,048
Obesas	Atividade BChE	IMC, -116G>A, 1615G>A e 1914A>G	IMC, -116G>A e 1615G>A	$(-0,146 \pm 0,073)$ , $(-0,160 \pm 0,073)$ e $(-0,189 \pm 0,73)$ , respectivamente	0,049; 0,03 e 0,01, respectivamente
Obesas	TG	IMC, -116G>A, 1615G>A, 1914A>G e atividade da BChE	IMC, 1615G>A e Atividade da BChE	$(-0,149 \pm 0,075)$ , $(-0,164 \pm 0,078)$ e $(-0,235 \pm 0,82)$ , respectivamente	0,049; 0,037 e 0,005, respectivamente

Considerando o desequilíbrio de ligação existente entre os três sítios estudados, foi conduzida uma análise com genótipos combinados. Diferenças significativas nas médias de atividade da BChE e TG permaneceram somente entre as obesas. As portadoras das combinações alélicas menos frequentes considerando

os três sítios (**Tabela 7**), e dois sítios combinados: 1615G>A e 1914A>G (**Tabela 8**), -116G>A e 1914A>G (**Tabela 9**), e -116G>A E 1615G>A (**Tabela 10**) apresentaram menor média de atividade da BChE e menores níveis médios de TG ( $p<0,05$ ) (Material suplementar).

## DISCUSSÃO

Considerando a hipótese de que polimorfismos do gene *BCHE* estejam associados a parâmetros metabólicos relacionados à obesidade, o presente estudo avaliou a influência de três SNPs (-116G>A, 1615G>A e 1914A>G) desse gene sobre atividade enzimática da BChE e marcadores de obesidade e metabolismo lipídico em mulheres obesas e não obesas.

Ao contrário do que já foi descrito (LIMA *et al.*, 2013), não encontramos associação do alelo G do sítio 1914A>G com a obesidade, assim como observado para os demais SNPs, uma vez que não houve diferença em suas frequências alélicas entre mulheres obesas e não obesas.

Por sua vez, a condição de obesidade é um fator a ser considerado na avaliação da atividade da BChE, já que diversos estudos mostram que indivíduos obesos tendem a apresentar atividade aumentada dessa enzima como resultado do aumento dos níveis de ésteres de colina, que são produtos do metabolismo de ácidos graxos livres e da lipogênese hepática, condições metabólicas estas associadas a obesidade (ALCANTARA *et al.*, 2005; RANDELL *et al.*, 2005; FURTADO-ALLE *et al.*, 2008). Em nosso estudo, no entanto, não foi observada diferença significativa na média de atividade da BChE entre obesas e não obesas. Isso pode ser devido à semelhança de perfil lipídico entre estas mulheres, uma vez que apenas o nível médio de triglicerídeos foi maior entre as obesas em comparação as não obesas. Esse resultado sugere que o excesso de tecido adiposo por si só pode não configurar fator determinante de diferenças na atividade da BChE, mas que um distúrbio metabólico com perfil lipídico desfavorável seja necessário. Um estudo de Iwasaki *et al.* (2004), que avaliou o grau de esteatose hepática em comparação com parâmetros de IMC e marcadores plasmáticos de função hepática em doadores de fígado, reforça essa hipótese ao mostrar que obesos sem esteatose

hepática mostram níveis normais de atividade da BChE, ao passo que tanto obesos quanto não obesos com essa condição apresentam atividade aumentada da BChE.

Além destes fatores endógenos ligados ao metabolismo influenciarem a atividade da BChE, os polimorfismos no gene codificador desta enzima também são associados a variações da sua atividade (BENYAMIN *et al.*, 2011). Nossos achados sugerem que o alelo -116A foi responsável por níveis médios de atividade enzimática mais baixos, tanto nas mulheres obesas quanto nas não obesas. Este resultado foi semelhante ao encontrado no estudo realizado por Furtado-Alle *et al.* (2008) que ao investigar a associação do polimorfismo -116G>A com IMC e atividade enzimática da BChE observaram que a atividade reduzida da BChE em decorrência da mutação -116A ocorre tanto em indivíduos obesos, quanto em não obesos. O efeito independente do SNP -116G>A na determinação da atividade da BChE foi confirmado em nosso estudo por análise de regressão múltipla em ambos os grupos, mas somente no grupo das obesas foi encontrado efeito independente também do IMC sobre esta variável. A contribuição relativa do IMC para a atividade da BChE parece responder a fatores metabólicos internos, sendo que em contextos de desequilíbrio da homeostase, como o causado pela obesidade, sua contribuição pode vir a se tornar significativa, no entanto, não foi suficiente para acarretar em níveis de atividade enzimática maiores entre as mulheres obesas que compuseram nosso estudo, salientando portanto mais uma vez o possível efeito preponderante do perfil lipídico sobre esta variável.

O genótipo heterozigoto dos polimorfismos 1615G>A e 1914A>G também conferiu as suas portadoras obesas médias de atividade enzimática menores, sendo que apenas o SNP 1615G>A teve o seu efeito independente corroborado pelos resultados da análise de regressão. Estes resultados sugerem que o efeito destes SNPs sobre a atividade enzimática pode ser diferencial e dependente também da situação de homeostase metabólica. O impacto diferencial destes SNPs em resposta a condição de obesidade indica que modulações subjacentes a determinadas condições fisiopatológicas podem estar influenciando esta relação.

O efeito diferencial destes SNPs foi observado também sobre os níveis de triglicerídeos. Somente as mulheres obesas, portadoras do genótipo homozigoto menos frequente para cada um destes sítios (1615G>A e 1914A>G), apresentaram

médias menores de TG comparadas às portadoras do genótipo homozigoto frequente. Somente o efeito independente do sítio 1615G>A foi confirmado por regressão, o que pode indicar que a diferença entre as médias de TG das portadoras dos genótipos do sítio 1914A>G foi em decorrência do efeito do desequilíbrio de ligação entre estes sítios. O IMC e a atividade da BChE também demonstraram possuir efeito independente na determinação dos níveis plasmáticos de TG, sendo que a atividade da BChE e os níveis de TG demonstraram possuir correlação positiva nas mulheres obesas.

O efeito do polimorfismo 1615G>A sobre a atividade da BChE e sobre os níveis de TG nas mulheres obesas parece ser independente, uma vez que a composição genotípica que confere níveis mais baixos a estas variáveis é diferente. Parece existir um efeito de sobredominância subjacente ao nível de atividade enzimática da BChE, enquanto que sobre os níveis de TG o efeito parece ser aditivo do alelo G.

Enquanto nosso estudo indica relação do SNP 1615G>A com atividade enzimática da BChE em obesas, na literatura não é encontrada associação entre o SPN 1615G>A do gene *BCHE* e níveis de TG. Mas, forte correlação para atividade da BChE e níveis de TG já foi descrita há algum tempo (Iwasaki et al, 2007; Benyamin et al., 2011). Cucunianu *et al.* (2011) propõem como explicação para essa relação entre BChE e níveis de TG, que o aumento do fluxo de ácidos graxos do tecido adiposo para o fígado estimule a síntese hepática da BChE. Kálmán *et al.* (2004) ao encontrarem associação positiva entre atividade da BChE plasmática e níveis de colesterol e TG séricos, sugerem que a alteração na atividade pode ser decorrente de mudanças na estrutura terciária e quaternária da enzima, devido a hiperlipidemia. Também já foi considerado possíveis efeitos de outros genes que estão na interface entre metabolismo lipídico e de carboidratos que podem estar aumentando o perfil de risco metabólico e dessa forma afetar indiretamente a atividade da BChE por meio dos níveis de TG (BENYAMIN *et al.*, 2011). Os mecanismos moleculares dessa associação ainda permanecem incertos e não é bem esclarecido se a variação na BCHE é causa de anormalidades metabólicas ou se essa variação é secundária.

Em conclusão, podemos sugerir que um status lipídico desfavorável seja fator determinante na diferença de atividade entre obesas e não obesas e que as variáveis genéticas -116G>A e 1615G>A apresentam associação com parâmetros de atividade da BChE e níveis de TG, sendo o efeito do SNP -116G>A sobre atividade da BChE independente da condição de obesidade e o efeito do SNP 1615G>A dependente de um perfil de risco metabólico como o caracterizado pela obesidade.

## REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SCARTEZINI, M.; CERCI, M.S.; BRAUN-PRADO, K. e PICHETH, G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 62, P. 399-404, 2002.

ALCANTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; REA, R.R.; SUPPLY, H.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Clin. Chem. Lab. Med.** v. 43, p. 285-288, 2005.

BENYAMIN, B., *et al.* GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. **Hum. Mol. Genet.** 20, 4504–4514, 2011.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem. J.** v. 260, p. 625-634, 1989.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. *et al.* The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.** v. 41, p. 330-339, 1991.

CHAVES, T.J., *et al.* -116A and K BCHE gene variants associated with obesity and hypertriglyceridemia in adolescents from Southern Brazil. **Chem. Biol. Interact.** v. 203, p. 341–343, 2013.

CUCUIANU, M.; NISTOR, T.; HANCU, N.; ORBA, I. P.; MUSCURE, L. C.; STOIAN, I. Serum cholinesterase activity correlates with serum insulin, C-peptide and free fatty acids levels in patients with type 2 diabetes. **Rom J Intern Med.** v. 40, p. 43-51, 2002.

FURTADO-ALLE, L. *et al.* Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. **Chemico-Biological Interactions.** v. 175, p. 115–118, 2008.

IWASAKI, M.; TAKADA, Y.; HAYASHI, M. *et al.* Noninvasive evaluation of graft steatosis in living donor liver transplantation. **Transplantation.** v. 78, p. 1501–5, 2004.

KALMAN, J.; JUHASZ, A.; RAKONCZAY, Z.; ABRAHAM, G.; ZANA, M.; BODA, K.; *et al.* Increased serum Butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sci.** v.75(10), p.1195-204, 2004.



LAHIRI, D. K. e NURNBERGER JR., J. L. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p. 5444, 1991.

LIMA, J.K.; LEITE, N.; TUREK, L.V.; SOUZA, R. L. R.; TIMOSSI, L. da S.; OSIECKI, A. C. V.; OSIECKI, R. ALLE-FURTADO, L. 1914G variant of *BCHE* gene associated with enzyme activity, obesity and triglyceride levels. **Gene** v. 532, p. 24–26, 2013.

MILANO, G. E.; LEITE, N.; CHAVES, T. J.; MILANO, G. E.; SOUZA, R. L. R.; ALLE, L. F. Atividade da butirilcolinesterase e fatores de risco cardiovascular em adolescentes obesos submetidos a um programa de exercícios físicos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 57(7):533-7, 2013.

RANDELL, E.W.; MATHEWS, M.S; ZHANG, H.; SERAJ, J.S.; SUN, G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem*, v. 38, p. 799-805, 2005.

SCACCHI, R.; RUGGERI, M.; CORBO, R.M. Variation of the butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) genes in coronary artery disease. **Clin. Chim. Acta**. v. 412, p. 1341–1344, 2011.

SILVA, I.M.W. *et al.* Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents. **Genet. Mol. Biol.** v. 35, p. 741–742, 2012.

WESCOE, W. C.; HUNT, C. H.; RIKER, W. F. e Litt, I. C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol** 149: 549-51, 1947.

## Material Complementar

**Tabela 7.** COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS (+ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ENTRE HOMOZIGOTAS USUAIS E PORTADORAS DOS ALELOS MENOS FREQUENTES PARA OS SÍTIOS -116G>A, 1615G>A E 1914A>G, CONCOMITANTEMENTE

Parâmetro	Obesas			Não obesas		
	116AA + 1615AA + 1914GG	(-116AG+AA) + (1615AG+AA) + (1914AG+GG)	p	116AA + 1615AA + 1914GG	(-116AG+AA) + (1615AG+AA) + (1914AG+GG)	p
	(n = 81)	(n = 21)		(n = 32)	(n = 10)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	35,53 ± 0,61	34,37 ± 0,73	0,695	21,94 ± 0,35	22,04 ± 0,54	0,916
Atividade da BChE (kU/L)	5,37 ± 0,18	4,59 ± 0,35	<b>0,009</b>	5,23 ± 0,33	4,19 ± 0,44	0,175
HDL-C (mg/dL)	52,55 ± 1,58	51,24 ± 2,94	0,670	54,63 ± 2,70	50,4 ± 4,34	0,440
LDL-C (mg/dL)	113,00 ± 3,42	123,25 ± 6,64	0,164	120,01 ± 5,84	106,3 ± 5,71	0,219
TG (mg/dL)	148,22 ± 6,87	121,95 ± 11,40	<b>0,026</b>	93,41 ± 6,63	120,9 ± 25,43	0,937
CT (mg/dL)	194,99 ± 3,90	198,85 ± 7,99	0,658	190,06 ± 7,86	179,9 ± 9,35	0,322

**Tabela 8.** COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS (+ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ENTRE HOMOZIGOTAS USUAIS E PORTADORAS DOS ALELOS MENOS FREQUENTES PARA OS SÍTIOS, 1615G>A E 1914A>G, CONCOMITANTEMENTE

Parâmetro	Obesas			Não obesas		
	1615AA + 1914GG	(1615AG+AA) + (1914AG+GG)	p	1615AA + 1914GG	(1615AG+AA) + (1914AG+GG)	p
	(n = 86)	(n = 64)		(n = 32)	(n = 10)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	35,51 ± 0,6	35,96 ± 0,64	0,469	21,93 ± 0,35	22,37 ± 0,35	0,378
Atividade da BChE (kU/L)	5,34 ± 0,17	4,91 ± 0,20	<b>0,039</b>	5,23 ± 0,33	4,98 ± 0,35	0,850
HDL-C (mg/dL)	52,63 ± 1,49	49,08 ± 1,39	0,202	54,63 ± 2,70	54,6 ± 3,31	0,816
LDL-C (mg/dL)	113,12 ± 3,34	117,7 ± 3,62	0,322	120,01 ± 5,84	107,21 ± 7,34	0,422
TG (mg/dL)	146,95 ± 6,57	124,63 ± 6,22	<b>0,014</b>	93,41 ± 6,63	107,47 ± 12,93	0,401
CT (mg/dL)	194,94 ± 3,8	191,6 ± 4,33	0,563	190,06 ± 7,86	180,24 ± 11,67	0,471

**Tabela 9.** COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS (+ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ENTRE HOMOZIGOTAS USUAIS E PORTADORAS DOS ALELOS MENOS FREQUENTES PARA OS SÍTIOS -116G>A E 1914A>G, CONCOMITANTEMENTE

Parâmetro	Obesas		p	Não obesas		p
	-116AA + 1914GG	(-116AG+AA) + (1914AG+GG)		-116AA + 1914GG	(-116AG+AA) + (1914AG+GG)	
	(n = 88)	(n = 25)		(n = 33)	(n = 11)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	35,42 ± 0,59	35,96 ± 0,64	0,751	21,97 ± 0,39	21,84 ± 0,57	0,839
Atividade da BChE (kU/L)	5,33 ± 0,17	4,91 ± 0,20	<b>0,002</b>	5,19 ± 0,32	4,30 ± 0,50	0,203
HDL-C (mg/dL)	52,57 ± 1,44	49,08 ± 1,39	0,948	54,27 ± 2,63	51,22 ± 4,76	0,487
LDL-C (mg/dL)	112,63 ± 3,29	117,7 ± 3,62	0,211	121,37 ± 5,82	103,67 ± 5,66	0,181
TG (mg/dL)	150,76 ± 6,76	124,63 ± 6,22	<b>0,046</b>	92,57 ± 6,48	103,33 ± 20,56	0,880
CT (mg/dL)	195,16 ± 3,66	191,6 ± 4,33	0,661	191, ± 7,67	174,44 ± 8,47	0,290

**Tabela 10.** COMPARAÇÃO (p) DAS MÉDIAS (+ ERRO PADRÃO) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS EM OBESAS E NÃO OBESAS ENTRE HOMOZIGOTAS USUAIS E PORTADORAS DOS ALELOS MENOS FREQUENTES PARA OS SÍTIOS -116G>A E 1615G>A, CONCOMITANTEMENTE

Parâmetro	Obesas		p	Não obesas		p
	-116AA + 1615AA	(-116AG+AA) + (1615AG+AA)		-116AA + 1615AA	(-116AG+AA) + (1615AG+AA)	
	(n = 139)	(n = 28)		(n = 50)	(n = 13)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	35,05 ± 0,43	34,21 ± 0,68	0,751	22,11 ± 0,26	22,04 ± 0,54	0,890
Atividade da BChE (kU/L)	5,52 ± 0,15	4,39 ± 0,30	<b>0,000</b>	5,40 ± 0,28	4,2 ± 0,45	0,056
HDL-C (mg/dL)	51,6 ± 1,14	52,11 ± 2,77	0,907	53,18 ± 2,07	50,4 ± 4,34	0,419
LDL-C (mg/dL)	114,53 ± 2,68	122,34 ± 5,39	0,195	119,8 ± 4,96	106,3 ± 5,71	0,153
TG (mg/dL)	150,35 ± 6,81	122 ± 9,65	<b>0,043</b>	99,98 ± 6,89	120,9 ± 25,43	0,792
CT (mg/dL)	196,32 ± 3,15	198,82 ± 6,68	0,743	189,86 ± 7	179,9 ± 9,34	0,543

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA R.S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends. Endocrinol. Metab.** v.11, p. 327-332, 2000.

ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SCARTEZINI, M.; CERCI, M.S.; BRAUN-PRADO, K. e PICHETH, G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 62, P. 399-404, 2002.

ALCANTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; REA, R.R.; SUPPLY, H.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Clin. Chem. Lab. Med.** v. 43, p. 285-288, 2005.

ALTAMIRANO, C.V.; BARTELS, C.F.; LOCKRIDGE, O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild type enzyme. **J. Neurochem.**, v. 74, p. 869-877, 2000.

ANDREASEN, C.H.; ANDERSEN, G. Gene-environment interactions and obesity – Further aspects of genomewide association studies. **Nutrition.** v. 25, p. 998-1003, 2009.

ANNAPURNA, V.; SENCIAL, I.; DAVIS, A.J.; KUTTY, K.M. Relationship between serum pseudocholinesterase and triglycerides in experimentally induced diabetes mellitus in rats. **Diabetologia.** v.34, p. 320-324, 1991.

ARNER, P.; HELLSTRÖM, L.; WAHRENBERG, H.; BRÖNNEGARD, M. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. **J Clin Invest.** v. 86, p.1595-600, 1990.

AUGUSTINSSON, K.B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: Handbook of experimental pharmacology. Koelle, G.B. (org). Berlin e Nova York, **Springer-Verlag**, pp. 89-128, 1963.

BALASUBRAMANIAN, A. S. e BHANUMATHY, C. D. Noncholinergic functions of cholinesterases. **FASEB J.**, v. 7, p. 1354-58, 1993.

BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. e LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 50, p. 1086-103, 1992.

BARTELS, C.F.; VAN DER SPEK, A.F.L. e LA DU, B.N. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6171, 1990.

BENYAMIN, B., *et al.* GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within *BCHE* and secondary associations with metabolic risk factors. **Hum. Mol. Genet.** 20, 4504–4514, 2011.

BLONG, R.M.; BEDOWS, E.; LOCKRIDGE, O. Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *Biochem. J.*, v. 327, p. 747–757, 1997

BOBERG, D. R.; ALLE-FURTADO, L.; SOUZA, R. L. R.; MAIA-FREIRE-CHAUTARD, E. A. Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 452-454, 2010.

BOUCHARD C. Genetics of obesity: overview and research direction. In: Bouchard C, ed. **The Genetics of Obesity**. Boca Rato, 223–233, 1994.

BOUCHARD, C. Human obesities: Chaos or determinism? In: Ailhaud G, Guy-Grand B, Lafontane M, Ricquier C, eds. Obesity in Europe 91. Proceedings of the 3rd European Congress on obesity. Paris: John Libbey. p. 7-14, 1992.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem. J.** v. 260, p. 625-634, 1989.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. *et al.* The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.** v. 41, p. 330-339, 1991.

CHAVES, T.J., *et al.* -116A and K BCHE gene variants associated with obesity and hypertriglyceridemia in adolescents from Southern Brazil. **Chem. Biol. Interact.** v. 203, p. 341–343, 2013.

CHU, M.I., FONTAINE, P., KUTTY, K.M., MURPHY, D., REDHEENDRAN, R. Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. **Clin. Chim. Acta** 85, 55–59, 1978.

CLITHEROW, J.W., MITCHARD, M., HARPER, N.J. The possible biological function of pseudocholinesterase. **Nature** 199, 1000–1001, 1963.

ÇOKUĞRAŞ, A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. **Turk. J. Biochem.** v. 28, n. 2, p. 54-61, 2003.

CUCUIANU, M.; NISTOR, T.; HANCU, N; ORBA, I P.; MUSCURE, L C.; STOIAN, I. Serum cholinesterase activity correlates with serum insulin, C-peptide and free fatty acids levels in patients with type 2 diabetes. **Rom J Intern Med.** v. 40. p. 43-51, 2002.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. **J. Comp. Neurol.**, v.463, p. 25-43, 2003.

DE VRIESE, C.; GREGOIRE, F.; LEMA-KISOKA, R.; WAELEBROECK, M.; ROBBERECHT, P. & DELPORTE, C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. **Endocrinology**. v.145, p. 4997-5005, 2004.

DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. e HODGES, L.K. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. **Am. J. Genet.**, v. 24, p.58-64, 1972.

DIPIETRO, L.; KATZ, L.D.; NADEL, E.R. Excess abdominal adiposity remains correlated with altered lipid concentrations in healthy older women. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** v. 23, p. 432–436, 1999.

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE 2009/2010. ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da síndrome Metabólica. 3ª edição. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, 2009.

DOENICKE, A., GURTNER, T., KREUTZBERG, G., REMES, I., SPIESS, W., & STEINBEREITHNER, K. Serum cholinesterase anenzymia. Report of a case confirmed by enzyme-histochemical examination of liver-biopsy specimen. **Acta Anaesthesiol Scand**, v.7, p. 59–68, 1963.

ESTADÃO SAÚDE. Epidemia triplica o número de mortes por obesidade em dez anos no País. Disponível em: <<http://saude.estadao.com.br/noticias/geral,epidemia-triplica-o-numero-de-mortes-por-obesidade-em-dez-anos-no-pais-imp-,1159484>>. Acesso em: 13/11/2014.

EVANS, R.T. e WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. **Clin. Chem.**, v. 24, p. 1762-1766, 1978.

FANG, L.; HOU, SHURONG, H.; XUE, L.; ZHENG, F.; ZHAN, C-G. Amino-acid mutations to extend the biological half-life of a therapeutically valuable mutant of human butyrylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions*, v. 2014, p. 18–25, 2014.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; LIMA, F.B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatr (Rio J)**. v.83(5 Suppl), S192-203, 2007.

FREITAS C.S. *et al.* Perfil das mulheres obesas que procuram o programa de atividade física da Escola de Educação Física e Esporte. In: **V Congresso de Iniciação Científica e III Simpósio de Pós Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo**, São Paulo, p.87-8, 1998.

FURTADO-ALLE, L. *et al.* Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. **Chemico-Biological Interactions**. v. 175, p. 115–118, 2008.

GARN, S.M.; LEONARD, W.R.; HAWTHORNE, V.M. Three limitations of the body mass index. **Am J Clin Nutr.** v. 44, p. 996-997, 1986.

GEER, E.B.; SHEN, W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. **Gend Med**, v. 6, p.60-75, 2009.

HANIN, G.; SOREQ, H. Cholinesterase-Targeting microRNAs Identified in silico Affect Specific Biological Processes. **Front Mol Neurosci**, v. 4 (28), 2011.

HARRIS, H.; ROBSON, E. B.; GLEN-BOTT, A. M. e THORNTON, J. A. Evidence for nonallelism between genes affecting human serum cholinesterase. **Nature**, v. 200, p. 1185-1187, 1963.

HSU, F. C.; LENCHIK, L.; NICKLAS, B. J.; LOHMAN, K.; REGISTER, T. C.; MYCHALECKY, J.; LANGEFELD, C. D.; FREEDMAN, B. I.; BOWDEN, D.W. "Heritability of body composition measured by DXA in the diabetes heart study". **Obes Res.** vol. 13, n. 2, pp. 312-319, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro, 2010.

IWASAKI, M.; TAKADA, Y.; HAYASHI, M. *et al.* Noninvasive evaluation of graft steatosis in living donor liver transplantation. **Transplantation**. v. 78, p. 1501–5, 2004.

JBILLO, O. *et al.* Promoter and Transcription Start Site of Human and Rabbit Butyrylcholinesterase Genes. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 33, p. 20829-20837, 1994.

JBILLO, O. *et al.* Promoter and Transcription Start Site of Human and Rabbit Butyrylcholinesterase Genes. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 33, p. 20829-20837, 1994.

JOHNSON, G.; MOORE, S.W. Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells in vitro. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 18, p. 781–790, 2000.

JÚNIOR, J. D.; PEDROSA, R. G.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais da regulação do peso corporal: ação da leptina no desequilíbrio energético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, 2004.

KALMAN. J.; JUHASZ, A.; RAKONCZAY, Z.; ABRAHAM, G.; ZANA, M.; BODA, K.; *et al.* Increased serum Butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sci.** v.75(10), p.1195-204, 2004

KALOW, W. Pharmacogenetics: Heredity and the Response to Drugs. Philadelphia: W. B. Saunders Co, p. 69–136, 1962.

KALOW, W., & STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. **Can. J. Med. Sci.** v. 35, p. 1305–1320, 1957.

KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **J. Clin. Endocrinol.Metab.** v. 89, p. 2548–2556, 2004.

KNIGHTS, A.J.; FUNNELL, A.P.W.; PEARSON, R.C.M.; CROSSLEY, M.; BELLANDERSON, K.S. Adipokines and insulin action. **Adipocyte**, v.3, p.88-96, 2014.

KOPELMAN PG. Obesity as a medical problem. **Nature**. v.404, p. 635-643, 2000.

KUTTY, K. M. Review: Biological function of cholinesterase. **Clin. Biochem.** v. 13, p. 239-43, 1980.

LAHIRI, D. K. e NURNBERGER JR., J. L. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p. 5444, 1991.

LEHMANN, H., & RYAN, E. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. **Lancet.** v. 271, p. 124, 1956.

LIDDELL, J., LEHMANN, H., & SILK, E. A 'silent' pseudo-cholinesterase gene. *Nature* 193, 561–562, 1962.

LIMA, J.K.; LEITE, N.; TUREK, L.V.; SOUZA, R. L. R.; TIMOSSO, L. da S.; OSIECKI, A. C. V.; OSIECKI, R. ALLE-FURTADO, L. 1914G variant of *BCHE* gene associated with enzyme activity, obesity and triglyceride levels. **Gene** v. 532, p. 24–26, 2013.

LOCKRIDGE, O. *et al.* **Complete** aminoacid sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 549-557, 1987.

LOCKRIDGE, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. **Pharmacology e Therapeutics.** v. 148, p. 34-46, 2015.

MAES, H.H.; NEALE, M.C.; EAVES, L.J. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. **Behav. Genet.**, v. 27, p. 325-351, 1997.

MAHAN LK, ESCOTT-STUMP S. **Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia.** São Paulo: Roca, trad. A. Favano, 1998.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 988, p. 258-266, 1989.

MASSOULIE, J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* v. 11, p. 130–143, 2002.

MILANO, G. E.; LEITE, N.; CHAVES, T. J.; MILANO, G. E.; SOUZA, R. L. R.; ALLE, L. F. Atividade da butirilcolinesterase e fatores de risco cardiovascular em adolescentes obesos submetidos a um programa de exercícios físicos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 57(7):533-7, 2013.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_009031.1?from=5001&to=69562&report=genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_009031.1?from=5001&to=69562&report=genbank). Acessado em 29/10/2014.

NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; THOMSON, B.; GRAETZ, N.; MARGONO, C.; MULLANY, E.C.; BIRYUKOV, S.; ABBAFATI, C.; ABERA, S.F.; ABRAHAM, J.P.; ABURMEILEH, N.M. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in



children and adults during 1980—2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, p. 766 - 781, 2014.

PADEZ, C. Uma perspectiva antropológica da obesidade. **Antrop. Port.**, v.16/17, p.145-159, 1999/2000.

PARNAS, M. L. *et al.* Concordance of Butyrylcholinesterase Phenotype With Genotype. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 135, n. 2, p. 271-276, 2011.

PEIRIS AN, HENNES MI, EVANS DJ, WILSON RR, LEE MB, KISSEBAH AH. Relationship of anthropometric measurements of body fat distribution to metabolic profile in premenopausal women. **Acta Med Scand.** v.723:S179-S188, 1988

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. de P. Obesidade: Hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 47, n. 2, p. 111-127, 2003.

PODOLY, E., *et al.* The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology. **J. Biol. Chem.** 284 (25), 17170–17179, 2009.

PRICE R. Genetics and common obesities: background, current status, strategies, and future prospects. In: Wadden T, Stunkard AJ, eds. **Handbook for Obesity Treatment**. New York, NY: Guilford Press, p. 73–94, 2002.

RANDELL, E.W.; MATHEWS, M.S; ZHANG, H.; SERAJ, J.S.; SUN, G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem*, v. 38, p. 799-805, 2005.

RANKINEN, T.; PERUSSE, L.; WEISNAGEL, S.J.; ARGYROPOULOS, G.; WALTS, B.; PÉRUSSE, L.; BOUCHARD, C. The human obesity gene map: the 2001 update. **Obes Res** .v.10:196–243, 2002.

RANKINEN, T.; ZUBERI, A.; CHAGNON, Y. C., *et al.* The human obesity gene map: the 2005 Update. **Obesity**, v. 14, n. 4, p. 529-644, 2006.

ROBITZKI A. *et al.* Transfection of reaggregating embryonic chicken retinal cells with an antisense 5'-DNA butyrylcholinesterase expression vector inhibits proliferation and alters morphogenesis. **J. Neurochem.** v. 69, n. 2, p. 823-833, 1997.

ROSENBAUM, M.; PIETROBELLI, A.; VASSELLI, J.R.; HEYMSFIELD, S.B.;LEIBEL, R.L. Sexual dimorphism in circulating leptin concentration is not accounted for by differences in adipose tissue distribution. **Int J Obes Relat Metab Disord.** v.25, p.1365-71, 2001.

RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.e LUBRANO, T. E1<sup>K</sup>, another quantitative variant at cholinesterase locus1. **J. Med. Genet.**, v. 15, p. 27-29, 1978.

SCACCHI, R.; RUGGERI, M.; CORBO, R.M. Variation of the butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) genes in coronary artery disease. **Clin. Chim. Acta.** v. 412, p. 1341–1344, 2011.

SILVA, I.M.W. *et al.* Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents. **Genet. Mol. Biol.** v. 35, p. 741–742, 2012.

SISKOVA, K., *et al.* Influence of lipid imbalance on butyrylcholinesterase activity and biotransformation efficiency. **Pharmazie** 67, 345–350, 2012.

SKOLNIK, N.S.; RYAN, D.H. Pathophysiology, Epidemiology, and Assessment of Obesity in Adults. **J Fam Pract**, v. 63, p. s3-s10, 2014.

SNYDER, E.E.; WALTZ, B.; PERUSSE L, *et al.* The human obesity gene map: the 2003 update. **Obes Res.** v. 12, n. 3, p. 369–439, 2004.

SÖNMEZ, K.; AKÇAKOYUN, M.; AKÇAY, A.; DEMIR, D.; DURAN, N.E.; GENÇBAY, M.; DEĞERTEKİN, M.; TURAN, F. Which method should be used to determine the obesity, in patients with coronary artery disease? (Body mass index, waist circumference or waist-hip ratio). **Int J Obes**, v.27, p.341-346, 2003.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.2, p.294–302, 2001.

SOUZA, R.L.R.; CASTRO, R.M.V.; PEREIRA L.; FREUND, A.A.; CULPI L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Frequencies of the butyrylcholinesterase *K* mutation in the Brazilian population of European and African origin. **Hum. Biol.** v. 70, p. 965-70, 1998.

SOUZA, R.L.R.; MIKAMI, L.R.; MAEGAWA, R.O.B.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Four new mutations in the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood sample. **Mol. Genet. Metab.**, v. 84, p. 349-353, 2005.

STOLK, R.P.; MEIJER, R.; MALI, W.P.; GROBBEE, D.E.; VAN DER GRAAF, Y. Ultrasound measurements of intraabdominal fat estimate the metabolic syndrome better than do measurements of waist circumference. **Am J Clin Nutr.** v. 77, p. 857–860, 2003

STUNKARD A. J. *et al.* An adoption study of human obesity. **N. Engl J. Med**, v. 314 (4) p. 193-198, 1986.

SUN, H.; SHEN, M.L.; PANG, Y.-P.; LOCKRIDGE, O.; BRIMIJOIN, S. Cocaine metabolism accelerated by a re-engineered human butyrylcholinesterase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, vol. 302, n. 2, p. 710–716, 2002.

VIGITEL BRASIL 2012 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

VIJAYARAGHAVAN, S.; KARAMI, A.; AEINEHBAND, S.; BEHBAHANI, H.; GRANDIEN, A., *et al.* Regulated Extracellular Choline Acetyltransferase Activity— The Plausible Missing Link of the Distant Action of Acetylcholine in the Cholinergic Anti- Inflammatory Pathway. **PLoS ONE**. v. 8, 2013.

WADE, T.D.; BULIK, C.M.; HEATH, A.C.; MARTIN, N.G.; e EAVES, L.J. The Influence of Genetic and Environmental Factors in Estimations of Current Body Size, Desired Body Size, and Body Dissatisfaction. **Twin Res.**, Agosto, 2001.

WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr Rev**, v.21, p.697-738, 2000.

WARDLE, J.; CARNELL, S.; HAWORTH, C. M.; PLOMIN. R. “Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment”. **Am. J. Clin. Nutr.** vol. 87, pp. 398-404, 2008.

WASYLYK, B. *et al.* The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. **Nature**, v. 346, p. 191-193, 1990.

WESCOE, W. C.; HUNT, C. H.; RIKER, W. F. e Litt, I. C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol** 149: 549-51, 1947.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Mean Body Mass Index (BMI). **Global Health Observatory (GHO), Risk Factors**. Disponível em: <[http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/bmi\\_text/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/bmi_text/en/)> Acesso em: 23/02/2014.

## **6 APÊNDICES**

### **APÊNDICE 1 - METODOLOGIA**

#### **6.1 Amostragem**

O presente estudo foi realizado com uma amostra formada por 356 mulheres adultas, euro-brasileiras, de Curitiba e região metropolitana, estratificada em dois grupos: mulheres obesas ( $n = 264$ ) e não obesas ( $n = 92$ ). Todas as participantes receberam esclarecimentos individuais a respeito da pesquisa e condicionaram a sua participação de modo voluntário mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Os seguintes critérios de inclusão foram considerados para a composição do grupo de mulheres obesas: idade mínima de 20 anos, sexo feminino, IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, fase pré-menopausa e saúde aparente.

#### **6.2 Parâmetros investigados**

Foram obtidos dados antropométricos e bioquímicos utilizando amostras de sangue periférico coletadas com EDTA após um período de 8 a 12 horas de jejum.

Dentre as medidas antropométricas avaliou-se massa corporal (kg), estatura (m) e IMC (kg/m<sup>2</sup>). Dentre as variáveis bioquímicas foram medidos os níveis de colesterol total (mg/dL), colesterol HDL (mg/dL), colesterol LDL (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL), e atividade enzimática da butirilcolinesterase, BChE (kU/L). O perfil lipídico foi obtido por métodos automatizados. A medida da atividade da BChE e genotipagem dos polimorfismos -116G>A, 1615G>A e 1914 A>G foram realizadas em nosso laboratório, Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética da UFPR.

### 6.3 Análise genotípica do gene *BCHE*

#### 6.3.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada conforme metodologia de LAHIRI E NURNBERGER (1991). A metodologia consiste na separação de leucócitos, a partir de sangue periférico, de onde será extraído o DNA. Coleta-se cerca de 6 mL de sangue em EDTA e trata-se os constituintes celulares do mesmo. A porção leucocitária é ressuspensa em 10 mL de TKM1 (Tris-HCl 0,01M pH 7,6; KCl 0,01M; MgCl<sub>2</sub> 0,01M e EDTA 0,002M) e 125 µL de IGEPAL. Agitar até o desaparecimento dos grumos que se formam e em seguida centrifugar a 2500 rpm por cerca de 20 minutos. Em seguida, descartar o sobrenadante e completar novamente com 10 mL de TKM1. Repete-se a centrifugação e a ressuspensão com TKM1 até o precipitado (DNA, proteínas e lipídeos) ficar bem claro. Em seguida, adiciona-se 800 µL de TKM2 (Tris-HCl 0,01M pH 7,6; KCl 0,01M; MgCl<sub>2</sub> 0,01M; EDTA 0,002M e NaCl 0,4M) e agita-se. A solução homogeneizada é transferida para um tubo tipo *ependorf* e adiciona-se 50 µL de SDS 10% para dissolver o conteúdo lipídico que ainda existe no precipitado. Coloca-se em banho-maria 55 °C *overnight*. Retira-se do banho-maria e adiciona-se 200 µL de NaCl 5M, para a precipitação de proteínas, centrifuga-se a 1200 rpm por 20 minutos e em seguida transferir o sobrenadante (contendo o DNA) para um tubo de ensaio. Adicionam-se dois volumes de etanol absoluto gelado, tampa-se o tubo com parafilme e inverte-se delicadamente até precipitar o DNA. Transferir o DNA para um tubo tipo *ependorf* utilizando uma micropipeta de ponta cortada. Manter o tubo semi-aberto na estufa a 37 °C para o álcool evaporar. Após retirar da estufa, ressuspender o DNA em 300 µL de TE (Tris HCl pH 8 0,01M e EDTA pH 8 0,001M) e deixar em banho-maria a 55 °C por dois dias. Depois de retirado do banho-maria o DNA pode ser armazenado a -20°C.

#### 6.3.2 Genotipagem dos polimorfismos -116G>A, 1615G>A e 1914A>G

Após a extração, diluições com água destilada foram realizadas até as concentrações finais de 20 e 100 ng/µL para as genotipagens por meio do ensaio de discriminação alélica *TaqMan* e PCR-RFLP, respectivamente.

#### 6.3.2.1 Genotipagem TaqMan

As variantes alélicas dos sítios polimórficos nos -116G>A e 1615G>A foram determinadas por genotipagem *TaqMan* (*TaqMan SNP genotyping assays*) com kit *TaqMan SNP* (*Applied Biosystems*) e realizada no aparelho 7500 Real-Time PCR System da Applied Biosystems de acordo com os seguintes passos: (1) 50°C / 2 min., (2) 95°C / min., (3) repetir 50 vezes 95°C / 15 seg. intercalado por 62°C / min., (4) 60°C / min. A análise dos dados obtidos foi realizada com o auxílio do programa *TaqMan Genotyper Software v1.3* (Life Technologies Corporation, 2012).

#### 6.3.2.2 PCR-RFLP

Variante alélica do sítio polimórfico 1914A>G foram identificadas por análise RFLP (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). O fragmento do exon 4 contendo o polimorfismo após amplificação por PCR convencional foi submetido a um ensaio de restrição enzimática. Os ciclos da PCR foram programados do seguinte modo: (1) 95°C / 30 seg., (2) 95°C / 30 seg., (3) 55°C / 30 seg., (4) 72°C / 30 seg., (5) repetir 35 vezes do passo 2 ao 4, (6) 72°C / 10 min. Os seguintes *primers* foram utilizados: 5' AGCAAGAAAGAAAGTTGTGTGGGTCT 3' e 3' AGCAGAGCACTGTAATTTGGGGG 5'. A endonuclease de restrição utilizada foi a *XceI* (*NspI*) (*Thermo Scientific*), com protocolo estabelecido de acordo com recomendações estabelecidas pelo fabricante, cujo sítio de restrição reconhecido encontra-se no alelo 1914A, que ao ser clivado origina dois fragmentos. Para a reação de digestão enzimática dos produtos da PCR foram acrescentados 10 µL de óleo mineral para evitar evaporação durante a incubação por 15 horas a 37 °C.

Os fragmentos gerados pela clivagem foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida. O gel foi preparado em uma concentração de poliacrilamida a 8% (solução estoque poliacrilamida 30%: 29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol e água bidestilada em quantidade suficiente para completar 100 mL), incubado com tampão TBE 1x (diluído a partir de TBE 5x: 54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0 e água destilada em quantidade

suficiente para completar 1000 mL) e submetido a um campo elétrico de 250V, 35mA e 60W por 90 minutos.

Para a visualização das bandas eletroforéticas o gel foi colocado em um recipiente não metálico e imerso em solução aquosa de  $\text{HNO}_3$  (1%) por três minutos. Após duas lavagens com água destilada, o gel foi imerso em solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  (0,2%) e aquecido por 20 segundos no micro-ondas. Depois de duas novas lavagens com água destilada, o gel foi imerso em 60 mL de solução reveladora (170 mL de solução aquosa de  $\text{NaCO}_3$  2,96% e 92  $\mu\text{L}$  de formaldeído) até o escurecimento do líquido. O líquido escurecido é retirado e acrescenta-se o restante da solução reveladora na qual o gel foi mantido imerso até o aparecimento das bandas. Durante todas as etapas da revelação das bandas, o gel foi mantido em agitação.

#### 6.4 Determinação da atividade enzimática da BChE

A metodologia adotada para medir a atividade da BChE baseia-se na técnica de DIETZ *et al.* (1972), modificada por EVANS e WROE (1978), que utiliza propioniltiocolina como substrato a ser hidrolisado pela enzima, produzindo ácido propiônico e tiocolina. A tiocolina, por sua vez, reage com DTNB (ácido 5-5'-bisditio-2-nitrobenzóico) resultando em 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarelada cuja intensidade é medida no comprimento de onda de 410 nm.

O tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 utilizado na reação é constituído pela mistura de duas soluções. A primeira solução contém 4,73g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anidro bifásico (PM = 141,96) em 1000 mL de água destilada e a segunda solução contém 13,61g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada. O DTNB (0,423 mM) é dissolvido no tampão fosfato na proporção de 167g por 1000 mL. O substrato da BChE (propioniltiocolina 100 mM) é preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina em 10 mL de água destilada. Para a reação utiliza-se soro diluído 1:100 em água destilada.

A medida da atividade da BChE foi realizada no leitor de microplaca multifuncional Tecan *infinite*® M200 utilizando o *software* de operação *i-Control* com as seguintes configurações: temperatura de 25 °C, ciclo cinético de quatro ciclos

com intervalo de duração de 1 minuto, *shaking* de 3 segundos com amplitude de 1 mm e absorbância de 410 nm com múltiplas leituras por poço (2x2). Foi utilizada placa de 96 poços de fundo plano com adição 220  $\mu$ L de tampão fosfato com DTNB e 25  $\mu$ L de soro em cada poço. Para iniciar a leitura adicionou-se 5  $\mu$ L de substrato. As leituras foram realizadas nos intervalos de 1, 2 e 3 minutos a partir da leitura inicial. Após as quatro leituras calculou-se a  $\Delta$ /minuto (variação da absorbância por minuto) e considerando que as amostras são analisadas em duplicatas, a  $\Delta$ /minuto é calculada com base nas duas medidas de leitura obtidas. Com o valor da  $\Delta$ /minuto é obtém-se a atividade enzimática (KU/L), multiplicando-se o valor de  $\Delta$ /minuto pelo fator 93,6.

## 6.5 Análises estatísticas

Frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta, e a comparação entre grupos foi realizada pelo teste de  $\chi^2$ , assim como o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para testar a normalidade da distribuição das variáveis analisadas foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors. As comparações entre médias foram feitas por teste-t, para as variáveis com distribuição paramétrica, e por teste de Mann-Whitney para variáveis com distribuição não paramétrica.

Análises de regressão múltipla foram também utilizadas para averiguar o possível efeito de cada variável independente sobre a variável dependente em questão. A análise de correlação de Spearman (para variáveis não paramétricas) foi aplicada para verificar a inter-relação entre as variáveis.

Testes comparativos foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (5%).